



SISTEMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO E DE RESPOSTA AO *STRESS* DE *PETROMYZON MARINUS* L.

INFLUÊNCIA NO RECRUTAMENTO DE JUVENIS DE
BACIAS HIDROGRÁFICAS PORTUGUESAS NO
INÍCIO DA FASE DE MIGRAÇÃO TRÓFICA

Marta Sofia Garcia Candeias

Tese apresentada à Universidade de Évora
para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica

ORIENTADORES: *Rui Manuel Alves Ferreira*
Isabel Maria Simão Alves Pereira Ferreira

ÉVORA, JANEIRO DE 2017



Aos Pais, Mana, João e Amélia

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."

Isaac Newton

"A ciência vale sempre a pena, porque as suas descobertas, cedo ou tarde, sempre se aplicam".

Severo Ochoa

*"Qualquer um que pretenda ter mais que uma compreensão extremamente superficial da vida, em todas as suas
diversas manifestações, necessita da bioquímica."*

Sir Hans Krebs

Agradecimentos

Reservei as próximas linhas para perpetuar o meu total e sincero agradecimento a pessoas e organizações que, direta ou indiretamente, contribuíram ativamente para alcançar com clareza e astúcia os objetivos traçados para esta investigação:

- aos meus orientadores, Professor Doutor Rui Ferreira e Professora Doutora Isabel Alves-Pereira do Departamento de Química da Universidade de Évora, que me auxiliaram a traçar o rumo da presente investigação e à qual legaram um precioso contributo do seu vasto conhecimento científico, prestando-se a dirigir a concretização deste trabalho com extensa sabedoria, disponibilidade permanente, dedicação ímpar e apoio incessante na superação dos diversos desafios que foram emergindo ao longo desta jornada académica;
- ao Professor Doutor Pedro Raposo de Almeida do Departamento de Biologia da Universidade de Évora, por me ter confiado a participação na equipa de investigação no âmbito do Projeto PTDC/BIA-BEC/103258/2008 (RECRUIT), financiado pela FCT, no âmbito do qual este trabalho se inseriu;
- aos outros membros da equipa do projeto RECRUIT, nomeadamente o Doutor Bernardo Quintella e a Mestre Ana Filipa Ferreira do MARE, pela identificação da localização geográfica dos juvenis, captura, manutenção e apoio à sua eutanásia;
- ao Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas ICAAM, pelo apoio financeiro, facilidades e utilização do espectrómetro de fluorescência que contribuiu em muito para o desenrolar deste trabalho;
- ao Departamento de Química, Universidade de Évora, pelas facilidades proporcionadas à concretização deste estudo;
- ao Fluviário de Mora, Parque Ecológico do Gameiro, pelas facilidades proporcionadas à manutenção dos animais;
- às funcionárias Custódia e D. Esperança do laboratório da Fase III do Departamento de Química da Universidade de Évora, pela sua simpatia e disponibilidade em ajudar sempre que necessário com o material de laboratório;
- aos estagiários e mestrandos de Bioquímica que passaram pelo laboratório durante esta jornada académica, pois de modo subtil também contribuíram para a boa disposição no mesmo local de trabalho;
- aos meus amigos mais próximos pelo seu apoio e estímulo, em especial, à Joana pois, juntas, travámos amizade, desafiámos os nossos limites de conhecimento realizando experiências laboratoriais e participando em congressos que tornaram esta investigação além de possível, mais divertida;
- aos meus pais, por me inculcaram amor ao estudo e à realização profissional, bem como, pela sua tolerância, compreensão e carinho que sempre se dispuseram a dar;
- à minha irmã, pelo amor incondicional, apoio, orgulho e inspiração para prosseguir com o trabalho;
- ao meu marido e filha, por serem o melhor de mim.

Obrigada =)

Índice

Agradecimentos	I
Índice	III
Índice de Figuras	V
Índice de Quadros	VIII
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas	XI
Resumo	XV
Abstract	XVII
1. Fundamento Teórico	1
1.1. Lampreia-marinha	3
1.2. Complexo AhR - papel biológico	8
1.3. Sistemas de biotransformação	11
1.3.1. Reações de hidrólise – Fase I de biotransformação	13
1.3.2. Reações que envolvem o sistema citocromo P450 – Fase I de biotransformação	14
1.3.3. Reações de conjugação – Fase II de biotransformação	21
1.3.4. Reações da fase III de biotransformação	24
1.3.5. Agentes bi e monofuncionais	26
1.4. Stress oxidativo	27
1.5. Atrazina	35
1.6. Objetivos	38
2. Metodologia	41
2.1. Estratégia	43
2.2. Organigrama do trabalho	45
2.3. Procedimento experimental	46
2.3.1. Delineamento dos ensaios	46
2.3.2. Locais de captura e manutenção dos animais	49
2.3.3. Caracterização morfométrica	55
2.3.4. Fracionamento celular	57
2.3.4.1. Recolha e determinação do peso húmido dos órgãos	57
2.3.4.2. Preparação dos homogeneizados	57
2.3.4.3. Preparação das frações mitocondrial, microsomal e citosólica	57
2.3.5. Doseamentos nas frações subcelulares	58
2.3.5.1. Determinação da concentração de proteína total	58
2.3.5.2. Determinação da concentração de hemo	59
2.3.5.3. Determinação da concentração de glutatono e dissulfureto de glutatono	59
2.3.5.4. Determinação da concentração de espécies reativas de oxigénio	60
2.3.5.5. Determinação da peroxidação lipídica	61
2.3.6. Determinação de atividades enzimáticas	62
2.3.6.1. Fosfatase alcalina	62
2.3.6.2. NADPH citocromo P450 redutase	62
2.3.6.3. 7-etoxicumarina-O-desetilase	63
2.3.6.4. Uridina-difosfato glicuronosil transferase	64
2.3.6.5. Glutatono S-transferase	65
2.3.6.6. Glutatono redutase	66
2.3.6.7. Glutatono peroxidase	66
2.3.6.8. Glucose-6-fosfato desidrogenase	67
2.3.6.9. Superóxido dismutase	68
2.3.6.10. Catalase	69
2.3.7. Análise estatística dos resultados	69
2.4. Equipamento	77
2.5. Reagentes	77

3. Resultados e Discussão.....	79
3.1. Caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I)	81
3.1.1. Biometria	82
3.1.2. Biotransformação.....	87
3.1.2.1. Tecido hepático	87
3.1.2.2. Tecido branquial	92
3.1.3. Stress oxidativo e defesas antioxidantes	96
3.1.3.1. Tecido hepático	96
3.1.3.2. Tecido branquial	102
3.2. Caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II)	107
3.2.1. Biometria	108
3.2.2. Biotransformação.....	113
3.2.2.1. Tecido hepático	113
3.2.2.2. Tecido branquial	117
3.2.3. Stress oxidativo e defesas antioxidantes	120
3.2.3.1. Tecido hepático	120
3.2.3.2. Tecido branquial	125
3.3. Caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III)	131
3.3.1. Biometria	131
3.3.2. Biotransformação.....	133
3.3.2.1. Tecido hepático	133
3.3.2.2. Tecido branquial	136
3.3.3. Stress oxidativo e defesas antioxidantes	138
3.3.3.1. Tecido hepático	138
3.3.3.2. Tecido branquial	143
3.4. Caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV)	149
3.4.1. Biometria	149
3.4.2. Biotransformação.....	150
3.4.2.1. Tecido hepático	150
3.4.2.2. Tecido branquial	152
3.4.3. Stress oxidativo e defesas antioxidantes	154
3.4.3.1. Tecido hepático	154
3.4.3.2. Tecido branquial	158
4. Conclusões.....	165
5. Referências Bibliográficas	181
ANEXOS	201

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Juvenis de <i>Petromyzon marinus</i> , L. da bacia do Lima em aquário dulçaquícola.	3
Figura 1.2 - Ciclo de vida da lampreia-marinha, <i>Petromyzon marinus</i> , L.	4
Figura 1.3 - Mapa de distribuição de <i>Petromyzon marinus</i> , L. no Atlântico norte.	5
Figura 1.4 - Mapa de Portugal com sinalização das bacias hidrográficas portuguesas onde se pode encontrar lampreia-marinha.	6
Figura 1.5 - Domínio estrutural e função do complexo AhR.	9
Figura 1.6 - Regulação da transcrição de genes alvo pelo complexo AhR.	10
Figura 1.7 - Ciclo de reação que envolve a participação do sistema P450 na oxigenação do substrato.	16
Figura 1.8 - Biotransformação bietápica de xenobióticos	20
Figura 1.9 - Consumo do substratos exógenos/endógenos por enzimas de biotransformação.	20
Figura 1.10 - Diagrama representativo de algumas vias de reposta a metabolitos reativos, de geração de ROS e seus alvos celulares, bem como de vias antioxidantes de organismos eucariontes.	31
Figura 1.11 - Representação estrutural da atrazina	35
Figura 2.1 - Diagrama representativo do delineamento experimental dos ensaios estabelecidos para avaliar os sistemas de biotransformação e de resposta ao <i>stress</i> de <i>P. marinus</i> , em particular a sua influência no recrutamento de juvenis das bacias hidrográficas portuguesas Minho, Lima, Vouga e Mondego no início da migração trófica.	49
Figura 2.2 - Visão lateral da região anterior das fases larval (amocete), metamórfica (1 a 7) e adulto jovem de <i>Petromyzon marinus</i> , L.	50
Figura 2.3 - Mapa de Portugal com localização das bacias hidrográficas: Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro).	50
Figura 2.4 - Precipitação total nos meses de captura de juvenis de lampreia-marinha nas bacias hidrográficas do Minho (Mi), Lima (L), Vouga (V), Mondego (Mo).	52
Figura 2.5 - Desvios da quantidade de precipitação total em Portugal Continental em relação ao normal.	53
Figura 2.6 - Aquários com temperatura controlada e protegidos da luz utilizados para permanência dos juvenis de lampreia-marinha durante os ensaios.	54
Figura 2.7 - Representação gráfica da curva de Gauss.	71
Figura 3.1 - Conteúdo em hemo (A) e atividades enzimáticas CPR (B) e ECOD (C) da fração microsomal hepática de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro) do Ensaio I.	88
Figura 3.2 - Atividades enzimáticas UDPGT (A) e mGST (B) da fração microsomal e cGST (C) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro) do Ensaio I.	91
Figura 3.3 - Atividades enzimáticas UDPGT (A) e mGST (B) da fração microsomal, e cGST (C) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro) do Ensaio I.	94
Figura 3.4 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro) do Ensaio I.	97

Figura 3.5 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C) e CTT1 (D) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro), do Ensaio I	100
Figura 3.6 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (cor azul claro), Lima (cor azul escuro), Vouga (cor verde claro) e Mondego (cor verde escuro) do Ensaio I. 103	103
Figura 3.7 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C) e CTT1 (D) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro), do Ensaio I	106
Figura 3.8 - Atividade enzimática ALP (A), conteúdo em hemo (B) e atividades enzimáticas CPR (C) e ECOD (D) da fração microsossomal hepática de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II.....	114
Figura 3.9 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II	116
Figura 3.10 - Atividade enzimática ALP do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II	117
Figura 3.11 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II	118
Figura 3.12 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II.....	121
Figura 3.13 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II	123
Figura 3.14 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II.....	126
Figura 3.15 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II	129
Figura 3.16 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol, conteúdo em hemo (B) e atividades enzimáticas CPR (C) e ECOD (D) da fração microsossomal hepática de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III	134
Figura 3.17 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III	135
Figura 3.18 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III	136
Figura 3.19 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III	137
Figura 3.20 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III	139
Figura 3.21 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III.....	141

Figura 3.22 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do mitocôndrio hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III.....	142
Figura 3.23 - Atividades enzimáticas GPx (A) e SOD2 (B) do mitocôndrio hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III.....	143
Figura 3.24 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III.....	144
Figura 3.25 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III.....	146
Figura 3.26 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do mitocôndrio branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio III.....	147
Figura 3.27 - Atividades enzimáticas GPx (A) e SOD2 (B) do mitocôndrio branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio III.....	148
Figura 3.28 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol, conteúdo em hemo (B) e atividades enzimáticas CPR (C) e ECOD (D) da fração microsossomal hepática de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	151
Figura 3.29 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol hepáticos de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	152
Figura 3.30 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	153
Figura 3.31 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	153
Figura 3.32 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	155
Figura 3.33 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	156
Figura 3.34 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do mitocôndrio hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	157
Figura 3.35 - Atividades enzimáticas GPx (A) e SOD2 (B) do mitocôndrio hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	157
Figura 3.36 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	159
Figura 3.37 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) de citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	160
Figura 3.38 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do mitocôndrio branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	162
Figura 3.39 - Atividades enzimáticas GPx (A) e SOD2 (B) do mitocôndrio branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	163

Índice de Quadros

Quadro 1.1 – Algumas reações de biotransformação de xenobióticos.....	12
Quadro 2.1 – Cronologia do período de captura dos juvenis de lampreia-marinha das bacias hidrográficas portuguesas Minho, Lima, Vouga e Mondego	51
Quadro 3.1 – Parâmetros morfométricos de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro), do Ensaio I.	82
Quadro 3.2 – Parâmetros morfométricos de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga, do Ensaio II.	108
Quadro 3.3 – Parâmetros morfométricos de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III.....	132
Quadro 3.4 –Parâmetros morfométricos de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV.....	150
Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biometria referente à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).	201
Quadro A2 –Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação hepáticos referente à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).	203
Quadro A3 –Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação branquiais referente à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).....	204
Quadro A4 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes hepáticos referente à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).....	204
Quadro A5 –Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes branquiais referentes à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).....	205
Quadro B1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biometria referente à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).	206
Quadro B2 –Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação hepáticos referente à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).	206
Quadro B3 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação branquiais referente à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).....	207
Quadro B4 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes hepáticos referente à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).....	207
Quadro B5 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes branquiais referentes à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).....	208
Quadro C1 –Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biometria referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).	209

Quadro C2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).	209
Quadro C3 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação branquiais referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).	210
Quadro C4 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).	210
Quadro C5 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes mitocondriais hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).	211
Quadro C6 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes branquiais referentes à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).	211
Quadro C7 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes mitocondriais branquiais referentes à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).	212
Quadro D1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biometria referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).	213
Quadro D2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).	213
Quadro D3 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação branquiais referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).	214
Quadro D4 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).	214
Quadro D5 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes mitocondriais hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).	215
Quadro D6 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes branquiais referentes à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).	215
Quadro D7 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes mitocondriais branquiais referentes à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).	216

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

$\cdot\text{O}_2^-$	Radical superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
AH	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
AhR	Recetor de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
AhRR	Repressores do recetor de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
ALP	Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)
ALT	Alanina aminotransferase (EC 2.7.6.1)
ARE	Elementos de resposta antioxidante
ARNT	Transportador do recetor nuclear de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
AST	Aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1)
ATZ	2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamina-1,3,5-triazina (atrazina)
B5R	Citocromo b5 redutase (EC 1.6.2.2)
bHLH	Domínio base helix-loop-helix
BSA	Albumina do soro bovino
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CAT	Catalases (EC 1.11.1.6)
CC	Células clorídricas (tipo de células ICC)
cDNA	DNA complementar
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
cGST	Glutationo <i>S</i> -transferase citoplasmática (EC 2.5.1.18)
CPR	NADPH citocromo (P450) redutase (EC 1.6.2.4)
CTA1	Catalase peroxissomal (EC 1.11.1.6)
CTT1	Catalase citoplasmática (EC 1.11.1.6)
Cu/ZnSOD	Cobre zinco superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
CYP1	Citocromo P450, família 1
CYP11	Citocromo P450, família 11
CYP17	Citocromo P450, família 17
CYP19	Citocromo P450, família 19
CYP1A	Citocromo P450, família 1A
CYP1A1	Citocromo P450, subfamília 1A1
CYP1A2	Citocromo P450, subfamília 1A2
CYP1B	Citocromo P450, família 1B
CYP1B1	Citocromo P450, subfamília 1B1
CYP2	Citocromo P450, família 2
CYP20	Citocromo P450, família 20
CYP21	Citocromo P450, família 21
CYP24	Citocromo P450, família 24
CYP26	Citocromo P450, família 26
CYP27	Citocromo P450, família 27
CYP2B1	Citocromo P450, subfamília 2B1
CYP2E1	Citocromo P450, subfamília 2E1
CYP2E6	Citocromo P450, subfamília 2E6
CYP3	Citocromo P450, família 3
CYP39	Citocromo P450, família 39
CYP3A	Citocromo P450, subfamília 3A

CYP4	Citocromo P450, família 4
CYP46	Citocromo P450, família 46
CYP5	Citocromo P450, família 5
CYP51	Citocromo P450, família 51
CYP7	Citocromo P450, família 7
CYP8	Citocromo P450, família 8
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorofluorescina
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluorescina
dGMP	Monofosfato de desoxiguanosina
DL ₅₀	Dose letal 50
DMRT	Teste de comparação múltipla de Duncan
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECOD	7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase (EC 1.14.14.1)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROD	7-etoxiresorufina <i>O</i> -desetilase (EC 1.14.14.1)
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
FeSOD	Ferro superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
FMN	Mononucleótido de flavina
G6PD	Glucose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)
GLSI	Índice branquio-somático
GP _x	Glutationo peroxidase (EC 1.11.1.9)
GR	Glutationo redutase (EC 1.6.4.2)
GSH	Glutationo
GSSG	Dissulfureto de glutationo
GST	Glutationo <i>S</i> -transferase (EC 2.5.1.18)
GW	Peso húmido das brânquias
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HLH	Domínio de proteínas
HSI	Índice hepato-somático
hsp90	Proteína de choque térmico p90
ICC	Tipos de células ricas em mitocôndrios
K	Fator de condição de Fulton
LPO	Lipoperóxidos
LR/lc	Nível global de baixo risco/pouco preocupante
LSD	Teste de significância
LW	Peso húmido do fígado
MDA	Malonaldeído
MDR	Proteínas de resistência múltipla a drogas
mGST	Glutationo <i>S</i> -transferase microsomal (EC 2.5.1.18)
MnSOD	Manganês superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
mRNA	RNA mensageiro
MXR	Proteínas de resistência múltipla a xenobióticos
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NBT	Sal de azul de tetrazólio

NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
OPT	<i>o</i> -ftalaldeído
p23	Proteína reguladora do ciclo celular
PAS	Superfamília de proteínas Per-Arnt-Sim
PCBs	Compostos policlorados bifenílicos
PGPs	Glicoproteínas P
pNPP	p-nitrofenilfosfato
pNP	p-nitrofenol
POP	Poluente orgânico persistente
RO [•]	Radical alcoxilo
ROO [•]	Radical peroxilo
ROOH	Organoperóxidos
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RSG	Produto conjugado da reação
RX	Composto eletrófilo
SDS	Duodecilssulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
SOD1	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) citoplasmática
SOD2	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) mitocondrial
TAD	Domínio de transativação
TBA	Ácido tiobarbitúrico
t-BHP	t-butil hidroperóxido
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-[p]-dioxina
TL	Comprimento total
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TW	Peso total
UDPGA	Ácido UDP-glicurónico
UDPGT	Uridina-difosfato glicuronosiltransferase (EC 2.4.1.17)
XAP2	Proteína associada à resposta ao vírus da hepatite B
XRE	Elementos de resposta a xenobióticos

Sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* de *Petromyzon marinus*

Resumo

O alvo principal deste estudo foi avaliar como a salinidade e/ou a exposição à atrazina, interagem com sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* oxidativo, hepáticos e branquiais de *Petromyzon marinus* L., no início da sua fase de migração trófica. A origem geográfica e a aclimação à salinidade geraram resultados com maior contraste nos parâmetros hepáticos e branquiais de *transformers* capturados nas bacias do Lima e do Vouga, motivo que determinou a sua seleção como bacia pristina e bacia com indicadores de maior exposição a xenobióticos, respetivamente. A segregação de *transformers* das bacias do Lima e do Vouga em grupos distintos, tendo em consideração a sua origem geográfica e/ou a resposta a salinidade 10, 25 e 35, pelos sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* oxidativo, confirmou as conclusões preliminares. A exposição a atrazina (50 e/ou 100 µg/L), em ambiente dulçaquícola, perturbou a capacidade de metabolização de xenobióticos e de resposta ao *stress* pelos efetivos da bacia do Lima, ilustrada pelo decréscimo do índice HSI e da razão GSH/GSSG citoplasmática branquial ou pelo aumento do conteúdo em MDA citoplasmático e mitocondrial hepático, de ROS citoplasmático branquial, de ROS e MDA mitocondrial branquial, bem como pelo decréscimo das atividades enzimáticas CPR microsomal, cGST, GPx e GR do citoplasma hepático. Assim, a exposição acidental ou permanentemente a níveis de atrazina iguais ou superiores a 50 µg/L poderá comprometer a migração trófica de juvenis de lampreia-marinha. A exposição à atrazina (50 µg/L) em ambiente salino provocou um decréscimo dos índices HSI e GLSI, das atividades CTT1 hepática e UDPGT branquial, bem como o aumento do conteúdo em GSSG e ROS citoplasmáticos branquiais de *transformers* do Lima, perturbações hepáticas e branquiais, que poderão igualmente comprometer, ainda que de forma mais atenuada, o sucesso da migração trófica de juvenis de *P. marinus* L.

Palavras-chave: Lampreia-marinha, aclimação ao sal, atrazina, citocromo P450, glutatióno.

Systems of biotransformation and *stress* response of *Petromyzon marinus* L

Abstract

The main purpose of this study was to evaluate how salinity and/or atrazine exposure interact with hepatic and branchial systems of biotransformation and oxidative stress response of *Petromyzon marinus* L., at the beginning of its trophic migration phase. The geographic origin and the acclimation to the salinity generated results with greater contrast in the hepatic and gill parameters of transformers captured in the Lima and Vouga basins, which determined their selection as pristine basin and basin with indicators of greater exposure to xenobiotics, respectively. The segregation of transformers from the Lima and Vouga basins into distinct groups, taking in account their geographic origin and/or its response to salinity 10, 25 and 35, by the systems of biotransformation and oxidative stress response, confirmed the early conclusions. Exposure of sea lamprey juveniles to atrazine (50 and/or 100 µg/L) in the fresh water, disrupted the capacity of xenobiotics metabolism and stress response of the animals of Lima basin, showed by the decrease in HSI index and cytoplasmic GSH/GSSG ratio of gills or by the increase in the contents of cytoplasmic and mitochondrial MDA of liver, cytoplasmic ROS of gills, mitochondrial ROS and mitochondrial MDA of gills, as well as the decrease in the microsomal CPR and cytoplasmic cGST, GPx and GR enzyme activities of liver. Thus, accidental or permanent exposure to 50 µg/L atrazine levels or higher, may compromise the trophic migration of sea lamprey juveniles. Exposure to atrazine (50 µg/L) in saline environment resulted in a decrease in the HSI and GLSI indexes, hepatic CTT1 and gills UDPGT activities, as well as the increase in cytoplasmic GSSG and ROS of gills of Lima transformers, which may also compromise, even though more attenuated, the success of the trophic migration of juveniles of *P. marinus* L.

Key-words: Sea lamprey, salt acclimation, atrazine, cytochrome P450, glutathione.

Capítulo 1

Fundamento Teórico

1.1. Lampreia-marinha

As lampreias (Petromyzontiformes) constituem, do ponto de vista zoológico, uma linhagem de vertebrados que apresenta características muito primitivas e um ciclo de vida peculiar. Provas paleobiológicas revelam que as espécies atuais possuem características morfológicas muito semelhantes às detetadas em fósseis de lampreias com 360 milhões de anos, destacando-se a existência de uma cartilagem anular em torno da boca, cartilagem lingual tipo pistão e forma de fixação tipo ventosa (1–8). As lampreias apresentam uma distribuição anti-tropical encontrando-se a sua distribuição delimitada a norte e a sul dos 30° de latitude e pela isotérmica dos 20 °C de temperatura média anual (3,9,10).

A lampreia-marinha (*Petromyzon marinus* L., 1758) é classificada filogeneticamente como pertencente ao super-reino Eukaryota; reino Metazoa; filo Chordata; Craniata; Vertebrata; Cyclostomata; Hyperoartia; ordem Petromyzontiformes; família Petromyzontidae; género *Petromyzon*; espécie *Petromyzon marinus* (5,15,17).

A lampreia-marinha é uma espécie anádroma que na forma adulta pode atingir entre 80 e 120 cm de comprimento e pesar até 2,2 Kg. Ao longo do seu ciclo de vida sofre alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas acentuadas, essenciais às duas migrações que realiza entre os meios dulçaquícola e marinho (Figura 1.1 e 1.2) (12–18).



Figura 1.1 - Juvenis de *Petromyzon marinus*, L. da bacia do Lima em aquário dulçaquícola (fotografias do autor).

O ciclo de vida da lampreia-marinha inicia-se em ambiente dulçaquícola com a eclosão dos ovos nos rios, originando os amocetes, denominação referente ao estado larvar antes da metamorfose, muito diferentes de um indivíduo na fase adulta (Figura 1.2) (17,19). A sua capacidade natatória é muito inferior à dos adultos ou de juvenis metamorfoseados. Os seus movimentos aquáticos são predominantemente determinados por alterações da corrente e/ou do nível das águas, constituindo as inundações um fator importante na sua redistribuição (3,17,20). Após abandonarem o ninho, os amocetes enterram-se no fundo dos rios em locais de pouca profundidade, com substratos de granulometria fina, como a areia ou a gravilha, de

águas límpidas e oxigenadas ($[O_2] > 5,5 \text{ mg/L}$). Nesta fase os amocetes alimentam-se por filtração (microalgas e diatomáceas) (17,20) (Figura 1.2). Em Portugal, a fase larvar prolonga-se geralmente por 4-5 anos e termina quando se completa a metamorfose, ocorrendo perda da cápsula oral, aparecimento dos olhos à superfície, aumento do tamanho das barbatanas dorsais e alteração da cor castanha para azul acinzentado na zona dorsal e prateado/esbranquiçado na zona ventral, passando as lampreias-marinhas recém-metamorfoseadas a ser designadas por macroftalmias ou *transformers* (Figura 1.2). Nesta fase, após completar a metamorfose, os *transformers*, beneficiando de um maior caudal fluvial no outono/inverno, abandonam o leito dos rios e iniciam a migração trófica em direção ao mar onde permanecem cerca de 2-3 anos. No oceano os adultos jovens encontram as espécies marinhas de que se alimentam e completam o seu crescimento até à fase de adulta, atingindo a maturação sexual. Esta fase em ambiente marinho é caracterizada pela alimentação parasítica (Figura 1.2) (3–5,21).



Figura 1.2 - Ciclo de vida da lampreia-marinha, *Petromyzon marinus* (adaptado de Correia) (22).

Na época da reprodução, as lampreias-marinhas adultas acumulam-se junto à desembocadura dos rios das principais bacias portuguesas e iniciam a sua migração reprodutora no final de dezembro/início de janeiro, com um pico nos meses de fevereiro/março que se prolonga até maio/junho. Durante a migração anádroma esta espécie não se alimenta. Os locais de desova ideais para a lampreia-marinha são caracterizados por sedimentos de gravilha e seixos com águas rápidas e de pouca profundidade. Nesta espécie, os machos chegam primeiro às áreas de desova e iniciam a construção de ninhos. Durante um complexo processo de acasalamento que pode durar vários dias, as fêmeas depositam os óvulos nos ninhos, para serem fecundados pelos machos. Os progenitores morrem após a postura, contrariamente ao que acontece com outras populações de espécies migradoras diádromas (Figura 1.2) (3,7,17,19,22,23).

Geralmente, a lampreia-marinha é capturada à entrada dos estuários quando inicia a sua migração reprodutora, de jusante para montante que nos rios portugueses tem o seu início

em dezembro. O pico piracema ocorre entre fevereiro e abril, e a desova entre maio e junho, dependendo das condições meteorológicas, a atividade migratória tem o seu início ao anoitecer e, em condições normais, termina ao amanhecer (7,13,15,17,24).

O nível de salinidade dos cursos de água altera-se acentuadamente durante a transição do meio dulçaquícola para o meio salino, sendo maioritariamente influenciado pelas correntes e pelo ciclo de marés (25). Em geral, a metamorfose prepara os amocetes para o habitat estuarino (21). Contudo a salinidade é considerada por diversos autores como agente tóxico, sendo passível de afetar a fauna e a flora do meio aquático. A maior parte desses estudos revelam que níveis excessivos ou diminutos de sal, perturbam o adequado desenvolvimento dos seres aquáticos, em particular causam um decréscimo da taxa de eclosão de ovos e/ou um atraso no recrutamento dos animais no estado larval, no crescimento, e no alcance da fase adulta (3,7,25–28).

A lampreia-marinha apresenta uma vasta distribuição pelas regiões costeiras do Atlântico norte, entrando nos rios da América do norte desde o Labrador até à Florida. No norte da Europa embora a sua ocorrência seja casual e rara, existem registos da sua presença na Noruega e no Mar Báltico, bem como na desembocadura de alguns rios da Polónia. As populações de lampreia-marinha mais importantes da Grã-Bretanha são as do sudoeste da Inglaterra, dos rios que drenam para o canal de Bristol e a sul, no País de Gales. Embora a presença de lampreia-marinha nos rios da Península Ibérica seja vulgar, os seus efetivos populacionais têm diminuído nas desembocaduras dos rios. Apesar de ser menos abundante no Mediterrâneo pode ser encontrada até à costa da Albânia, no mar Adriático em torno das ilhas de Malta, Córsega e Sicília, bem como na costa noroeste africana (3,9,12,13,29,30). Em particular, a lampreia-marinha pode ser encontrada em Portugal, Espanha, França, Itália, Holanda, Alemanha, Reino Unido, Irlanda, Dinamarca e Suécia (Figura 1.3).

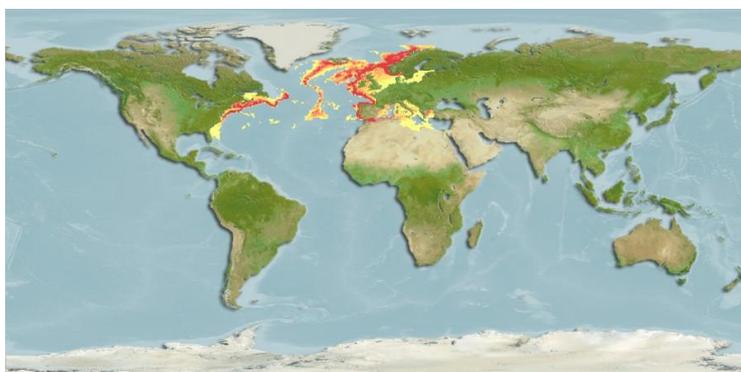


Figura 1.3 - Mapa de distribuição de *Petromyzon marinus* no Atlântico norte. A variação de tonalidade de vermelho (máximo) a amarelo (mínimo) reflete a densidade das populações da espécie (adaptado de www.aquamaps.org) (31).

Em Portugal, ocorre nas bacias hidrográficas dos rios Minho, Lima, Cávado, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana (Figura 1.4) (13,15,32). Contudo, a nível nacional tem-se observado um declínio acentuado da área de habitat utilizável pela lampreia-marinha que se prevê que seja inferior a 100 km². Estima-se que o efetivo populacional em Portugal, tendo em consideração o número de capturas de pescadores profissionais, não deve atingir os 100.000 indivíduos (19). Em Espanha, outro país ibérico, onde a área de ocupação é da ordem dos 2000 km², tem-se vindo a observar um declínio populacional acentuado desde o final do século XX (30). Devido ao elevado número de populações encontradas e registadas em cada local específico tem sido rotulada a nível global como LR/lc (baixo risco/pouco preocupante), embora a nível nacional, ou seja, como vulnerável (VU) (19,33).



Figura 1.4 - Mapa de Portugal com sinalização das bacias hidrográficas portuguesas onde se pode encontrar lampreia-marinha. O símbolo ▲ representa o primeiro obstáculo intransponível no habitat disponível para esta espécie em cada bacia hidrográfica (adaptado de Almeida, 2008) (15).

Os principais fatores de ameaça para esta espécie são a construção de barragens, a extração de inertes, a pesca excessiva e a perda de qualidade da água devido à presença de elevados níveis de poluentes tóxicos (34,35). A construção de barragens e açudes podem provocar a interrupção das rotas migratórias, a alteração do regime de caudais a jusante, a conversão de um sistema lótico em lântico, e a retenção de sedimentos a montante (19,28,36,37). Ao intervir nas rotas migratórias da lampreia-marinha, mesmo desenvolvendo sistemas de passagem alternativos, os indivíduos têm dificuldade em transpor os obstáculos, facto que pode impedir ou comprometer a reprodução desta espécie. Deste modo, a jusante das barragens podem acumular-se adultos reprodutores, local onde são geralmente alvos de pesca ilegal, e a montante os juvenis aquando da sua migração para o mar. A redução de

caudais, a homogeneização ao longo do ano ou a ocorrência de flutuações bruscas são possíveis alterações que podem modificar o regime de caudais a jusante, resultando na redução do habitat dulçaquícola disponível que culmina na perda de locais de crescimento, alimentação e desova. A alteração dos parâmetros físico-químicos da água e das comunidades animais e vegetais, como resultado da conversão de um sistema lótico em lântico, também pode interferir na composição das barragens (38). A ocorrência de retenção de sedimentos a montante e/ou a extração de materiais inertes pode intensificar a erosão das margens nessa área e alterar o leito do rio a jusante. Tal facto pode provocar o alargamento e consequente diminuição da profundidade e velocidade da corrente, e a desestabilização da vegetação ribeirinha, modificando assim os locais de abrigo, alimentação e desova, essenciais para o desenvolvimento dos juvenis, sendo grave se efetuada nas zonas e épocas de desova da espécie. Alterações de salinidade naturais são também consideradas um problema ambiental (36,37,39–41). O meio dulçaquícola é o que apresenta maior proporção de espécies ameaçadas de extinção, devido às alterações climáticas (28,42). As previsões fornecidas pelo “Intergovernmental Panel on Climate Change” (2007) defendem que o clima da região Mediterrânica continuará a sofrer um decréscimo dos níveis de precipitação, um aumento galopante da evaporação e consequentemente, seca intensa (40). Os referidos distúrbios ambientais serão potencialmente perigosos para espécies piscícolas podendo, no entanto, ser evolutivamente prevenidos se ocorrer uma rápida indução da capacidade de transporte salino pelas brânquias (41,43,44).

Por outro lado, descargas de efluentes não tratados de origem industrial e/ou urbana, bem como outras fontes de poluição difusa devidas à intensificação da utilização de produtos fitofarmacêuticos na agricultura, podem gerar níveis elevados de toxicidade com maior repercussão nos períodos de estiagem. Contudo, condições hipersalinas podem conferir às espécies piscícolas alguma proteção relativa à exposição a xenobióticos, como metais ou produtos fitofarmacêuticos que por vezes atingem e são arrastados pelos cursos de água em zonas urbanas, situações cujo impacte ambiental ainda não se encontra totalmente esclarecido (38,44–47).

A pesca excessiva e a utilização de meios de captura ilegais são fatores responsáveis pela diminuição de efetivos populacionais, os quais resultam do elevado valor comercial e gastronómico que esta espécie tem na Península Ibérica (13,19,37,48).

Assim, durante a fase larvar em água doce, os amocetes ou numa fase mais avançada, as macrofthalmias contactam diariamente com um amplo e variado conjunto de moléculas quimicamente diferentes (13,15,49,50). O processamento de algumas dessas substâncias

como glúcidos, proteínas e lípidos, nutrientes indispensáveis à sua sobrevivência, dá-se por vias metabólicas específicas evolutivamente aferidas. No entanto, compostos de circulação ambiental, como produtos fitofarmacêuticos podem ser convertidos esporadicamente em derivados mais polares. Nesse caso atuam vias de biotransformação, como as que envolvem o sistema citocromo P450 e enzimas de conjugação que os tornam mais excretáveis conferindo-lhes elevada solubilidade em água e acrescida capacidade de ionização a pH fisiológico (39,51–54). Todavia, os produtos da biotransformação revelam-se em muitos casos mais tóxicos do que os substratos de partida, exercendo efeitos geno ou citotóxicos que conduzem à morte celular (55). O próprio funcionamento dos sistemas de biotransformação gera espécies reativas de oxigénio como subprodutos, facto que os torna indutores de *stress* oxidativo (56,57).

1.2. Complexo AhR - papel biológico

A resposta adaptativa a xenobióticos ou a subprodutos reativos do metabolismo basal endógeno depende de redes metabólicas mediadas pelo seu recetor específico, conhecido por complexo recetor de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (AhR). O complexo AhR, tal como os osciladores moleculares circadianos, foram fortemente conservados ao longo do processo evolutivo, expressando-se em vertebrados e invertebrados. Embora a ativação de recetores AhR por compostos exógenos possa, por vezes, ser correlacionada com efeitos nocivos nos organismos vivos, a sua ativação por metabolitos endógenos desempenha um papel regulador essencial de processos e funções celulares básicas. O complexo AhR regula, por exemplo, a expressão de enzimas da Fase I (CYP1A1, CYP1B1) e da Fase II de biotransformação, a uridina-difosfato glicuronosil transferase (UDPGT) e glutathione *S*-transferase (GST) (58–61).

A organização estrutural do complexo AhR é comum à dos membros da superfamília de proteínas PAS (Per-Arnt-Sim) cuja sequência *N*-terminal contém um domínio bHLH (base helix-loop-helix) estreitamente envolvido no controlo da dimerização e posterior contacto dos domínios alcalinos da proteína com sequências reguladoras específicas do DNA. O domínio PAS do complexo AhR inclui ainda uma superfície de dimerização reconhecível pela proteína ARNT, que é o transportador do recetor nuclear para hidrocarbonetos arilo, e uma superfície de interação com proteínas de choque-térmico hsp90. A sequência *C*-terminal do complexo AhR inclui ainda uma região codificante hiper-variável denominada por domínio TAD (Figura 1.5) (61–65).

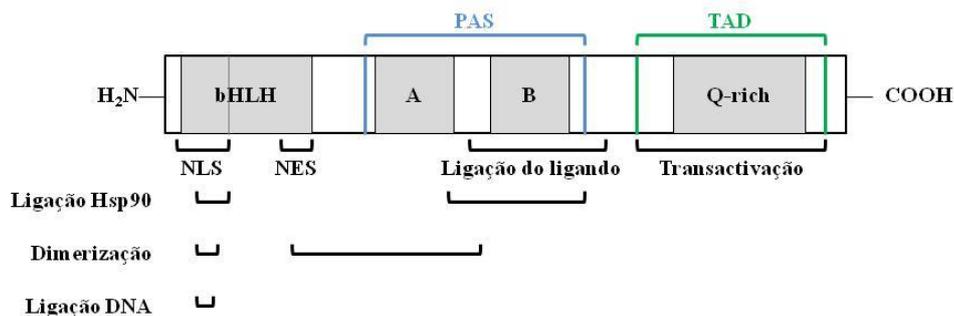


Figura 1.5 - Domínio estrutural e função do complexo AhR, NLS-sequência de sinal de localização nuclear; NES-sequência de sinal para exportação nuclear, TAD-domínio de transativação; bHLH-básico-helix-loop-helix e PAS-proteína Per-Arnt-Sim (adaptado de Monostory) (65,66).

O complexo AhR inativo reside no citoplasma ligado às *chaperones* hspP90, XAP2 e p23. O reconhecimento do ligando ativa o recetor AhR, expondo a sequência de localização nuclear (NLS) da região bHLH, por alteração conformacional da proteína, à qual se ligam as importinas. O complexo citoplasmático ativado migra então para o núcleo, desligando-se das *chaperones* e ligando-se à proteína ARNT, processo que envolve os domínios HLH e PAS de ambas as proteínas (58,63). O complexo heterodimérico AhR/ARNT liga-se então a sequências de consensus XRE (5'-T/GNGCGTGA/CG/CA-3') do DNA, ativando a expressão de genes alvo, tais como os que codificam o citocromo P450(1A1) (CYP1A1) (Figura 1.6) (58,63,66). Estudos com animais onde o gene AhR foi silenciado revelaram a importância deste complexo na mediação da maior parte dos efeitos tóxicos descritos para a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-[p]-dioxina (TCDD). A literatura revela ainda que fatores de transcrição pertencentes à família PAS estão fortemente envolvidos no controlo de processos biológicos como a morfogénese, ritmo circadiano, resposta a hipóxia e a toxinas, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento, deteção e adaptação dos seres vivos a condições ambientais (58,61,67,68).

A existência de comunicação cruzada bidirecional entre ritmos circadianos e metabólicos, neuro-endócrinos ou de sinalização celular mediadas por cito/quimiocinas, monoaminas, recetores e pós-recetores, facilita a modulação cruzada e progressiva dos sistemas de temporização circadiana. Contudo, alterações nesse conjunto de conexões por estímulos ambientais, devido a dessincronização entre processos biológicos e comportamentais podem despoletar mecanismos fisiopatológicos. Os xenobióticos e compostos endógenos reativos podem interferir fortemente em processos homeostáticos desempenhando um papel-chave no despoletar de respostas metabólicas com importância patológica (58,69). Os ligandos exógenos podem ser dioxinas halogenadas, compostos

bifenólicos policlorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (AH) ou ainda outros compostos com pouca relação estrutural com os anteriores (61).

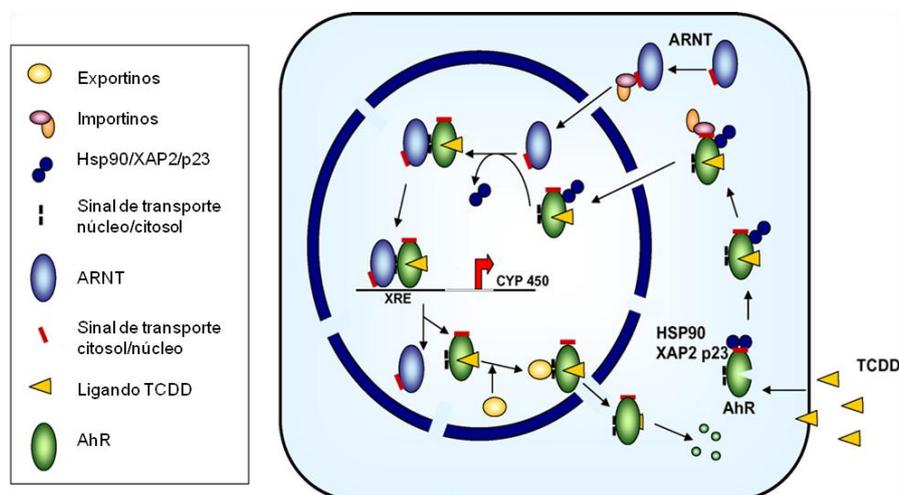


Figura 1.6 - Regulação da transcrição de genes alvo pelo complexo AhR. A ligação ao complexo citoplasmático despoleta vias de sinalização nuclear para a importação do complexo e induz a libertação das *chaperones* Hsp90, XAP2 e p23. No núcleo, o fator de transcrição ARNT liga-se ao AhR remanescente levando à formação de um heterodímero ativador da transcrição, capaz de reconhecer e de se ligar a sequências reguladoras de consenso (XRES) localizadas a montante da região promotora dos genes alvo. Após induzir a transcrição do gene alvo, o recetor AhR dissocia-se do fator de transcrição ARNT e exportados para o citoplasma onde são degradados (adaptado de Barouki, 2007) (63).

A TCDD destaca-se nesse conjunto de xenobióticos por ser ubiquamente dispersa, particularmente nos níveis tróficos mais elevados da cadeia alimentar (61). Os compostos naturais capazes de reconhecer o complexo AhR são em geral compostos químicos dos alimentos, tais como polifenóis, flavonóides (catequinas, flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas como o resveratrol), carotenóides e a berberina. Os ligandos produzidos endogenamente podem ser indigóis, equilenina ou derivados do hemo, ácido araquidónico e triptofano. O complexo AhR pode assim ser modulado por um conjunto de compostos endógenos e exógenos. Experiências com fibroblastos primários de embrião de ratinho, não expostos a xenobióticos, revelaram que repressores do complexo AhR exercem usualmente o seu efeito capturando a proteína ARNT e inibindo o sistema proteossoma-ubiquinina por transcrição ativa de células CV-1 não expostas a xenobióticos, mostrando também que a sobreexpressão transitória do complexo AhR e da proteína ARNT induzia a transcrição do CYP1A (58,70). Estudos de caracterização da expressão heteróloga do complexo AhR em invertebrados sugerem ainda que estas proteínas estão envolvidas no desenvolvimento celular, sem serem estimuladas por ligandos exógenos (58,71). Presume-se então que o envolvimento do complexo nos mecanismos de desintoxicação de xenobióticos corresponde a uma

aquisição funcional evolutiva recente (58,70,72) que mascara funções fisiológicas ancestrais. Desta forma, o heterodímero AhR/ARNT parece integrar um oscilador molecular que modula respostas neuro-endócrinas, imunológicas e metabólicas ainda pouco conhecidas (58,59). A ativação do complexo AhR de mamíferos pelo monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) parece estar fortemente associada à transferência do complexo citoplasmático para o núcleo e ao despoletar de vias de sinalização celular distintas das que são induzidas por ligandos exógenos, como a dioxina (58,73). Considerando que o cAMP citoplasmático constitui um modulador fulcral do sistema nervoso central e periférico de mamíferos e que os seus efeitos ao nível da transcrição do complexo AhR encontram-se coordenados com a expressão de genes circadianos, alguns autores admitem que o processo corresponde ao mecanismo evolutivo primário de regulação por metabolitos endógenos pelo complexo AhR. A rutura provocada por ligandos exógenos do processo mediado pelo cAMP poderá desempenhar um papel relevante no despoletar de mecanismos de toxicidade (58,74).

1.3. Sistemas de biotransformação

Os organismos vivos contactam ao longo da vida com xenobióticos de ocorrência natural ou e/ou sintetizados pelo Homem, tais como alcaloides, produtos do metabolismo secundário das plantas, toxinas de origem vegetal, animal, ou fúngica, produtos farmacêuticos e fitofarmacêuticos, derivados da pirólise de alimentos cozinhados e/ou efluentes da indústria agrícola e química. Grande parte destes compostos podem ser facilmente absorvidos pelas brânquias, pele, ou trato gastrointestinal, sendo as brânquias a principal via de absorção, devido ao facto de possuírem uma elevada superfície de contacto e consequentes trocas em permanência que estabelece com o meio aquático (23,28,75–77).

O termo biotransformação designa o conjunto amplo de processos que participam na deteção e metabolização de xenobióticos, convertendo-os, por vezes, em derivados mais polares e consequentemente mais solúveis em água. Esses processos são catalisados por enzimas, localizados maioritariamente no tecido hepático, que reconhecem uma ampla variedade de substratos. As alterações provocadas pela biotransformação de um substrato conferem aos seus derivados metabólicos propriedades físico-químicas que, em muitos casos, favorecem a sua reabsorção (lipofilicidade) ou a sua excreção (hidrofilicidade) (57,78).

O tipo e o nível de exposição aos xenobióticos constituem um fator que também pode influenciar a capacidade de biotransformação de um dado organismo. Por exemplo, os insetos que incluem na sua dieta maior variedade de plantas são aqueles que exibem maior

capacidade para realizar a biotransformação xenobióticos. Alguns autores referem também que as espécies piscícolas, comparativamente com os mamíferos, possuem menor capacidade para metabolizar xenobióticos, devido a grande parte destes ser eliminada pelas brânquias sem sofrer qualquer modificação química (69,70).

A indução enzimática despoletada durante a biotransformação de xenobióticos constitui, com frequência, uma resposta adaptativa reversível de um determinado organismo vivo a um dado composto, acelerando a sua modificação química e consequente eliminação. Sistemas enzimáticos como o citocromo P450 reconhecem e metabolizam ainda uma ampla variedade de produtos endógenos, tais como álcoois, cetonas, esteroides, vitaminas A e D, bilirrubina, ácidos biliares, ácidos gordos e eicosanóides. A sequência de resíduos de aminoácidos de um dado enzima envolvido na biotransformação de compostos exógenos pode diferir entre indivíduos, e assim condicionar diferentes taxas de biotransformação (69).

Os sistemas de biotransformação expressam-se em diferentes tecidos de lampreia-marinha, sendo maioritários no fígado. A localização celular desses sistemas é diversa, podendo ser detetada a sua presença no citoplasma, retículo endoplasmático e, em menor extensão, no mitocôndrio, núcleo e lisossoma (79,81). A maior parte das reações catalisadas pelos enzimas de biotransformação podem ser agrupadas em dois subgrupos, denominados Fase I e Fase II (79). A Fase I envolve reações de hidrólise, redução e oxidação, com eventual exposição/adição de grupos funcionais como o oxidrilo (-OH), amina (-NH₂), sulfidrilo (-SH) ou ácido carboxílico (-COOH). A Fase II inclui reações de conjugação, como por exemplo as de glicuronidação, sulfonação, acetilação, metilação, de conjugação com o glutathione (GSH) e de conjugação com aminoácidos, tais como glicina, taurina, e ácido glutâmico. A maior parte das reações de biotransformação conduzem a um aumento da polaridade do substrato de partida, alteração química que facilita a sua excreção. Os grupos funcionais expostos ou adicionados na Fase I de biotransformação constituem por vezes locais alvo das reações de biotransformação da Fase II. Esta fase de biotransformação de xenobióticos pode ser precedida ou não pela Fase I (79). No Quadro 1.1 são apresentadas as reações químicas catalisadas por enzimas de biotransformação determinadas neste estudo, bem como a sua localização, e que se irá descrever com maior pormenor nas seções subsequentes deste capítulo.

Quadro 1.1 – Algumas reações de biotransformação de xenobióticos (adaptado de Klaassen) (79).

Fase	Reação	Enzimas	Localização
I	Hidrólise	ALP	Membrana citoplasmática
	Oxidação/Redução	CYP	Retículo endoplasmático
II	Conjugação	UDPGT	
		GST	

1.3.1. Reações de hidrólise – Fase I de biotransformação

O termo fosfatase alcalina (ALP) designa uma família de isoenzimas cuja expressão varia de espécie para espécie e com as condições ambientais a que cada indivíduo se encontra exposto (82–84). Os substratos sintéticos e naturais que estas enzimas reconhecem possuem uma característica estrutural comum, um grupo fosfato em posição terminal que pode ser libertado para o meio celular quando o enzima reage como monofosfoesterase ou pode ser transferido para um substrato aceitador adequado quando funciona como fosfotransferase (82–86).

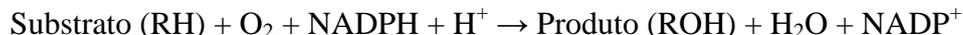
Apesar de o substrato natural específico e o papel biológico dos enzimas ALP não serem conhecidos, a literatura refere que exercem a sua atividade hidrolase sobre uma enorme variedade de monofosfoésteres. Na presença de um aceitador de grupos fosfato como o Tris ou a etanolamina reconhecem nucleotídeos, proteínas e alcalóides como substratos. Os enzimas ALP expressam-se na maior parte dos organismos vivos de forma diferencial em diferentes tecidos como o hepático e o branquial, sendo, por vezes, utilizados como marcadores de *stress* para avaliar efeitos ambientais, tais como o contacto com metais pesados e cloretos orgânicos, por organismos vivos do meio aquático (82,86,87).

Estudos comparativos da sequência primária de ALP de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. borealis*, *Bombyx mori*, *Gallus gallus domesticus* e *Homo sapiens* mostram que existe 25-45% de identidade sequencial entre ALP de diferentes espécies, sendo fortemente conservada a maior parte dos resíduos com importância funcional. No entanto, as propriedades cinéticas de diversas ALP, como a eficiência catalítica e o ótimo de pH, variam substancialmente, devido a alterações pontuais dos resíduos que constituem o centro ativo. Na maior parte dos animais, estes enzimas estão também envolvidos na proliferação, diferenciação, sinalização celular, meiose, migração celular, defesa imunitária, transporte transmembranar, apoptose (82–84). O contacto com xenobióticos pode provocar o decréscimo ou o aumento da atividade enzimática ALP. Abdelkhalek (2015) observou que o contacto com deltametrina provocou danos hepáticos por aumento das atividades enzimáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e ALP em *Oreochromis niloticus* (88). Por outro lado, Molina (2005) demonstrou que o contacto com microcistinas tóxicas produzidas por cianobactérias não alterou significativamente a atividade de ALP nas brânquias mas provocou um aumento desta atividade determinada no fígado de *Oreochromis sp* (89).

Os termos carboxilesterases e colinesterases designam outros enzimas hidrolíticos igualmente envolvidos em processos de desfosforilação. Do ponto de vista estrutural, esses enzimas são homodímeros que compartilham uma estrutura de topologia geral muito semelhante, sendo o seu centro ativo constituído por uma tríade de iões metálicos que inclui dois iões zinco e um ião magnésio. Do ponto de vista funcional, parece que são capazes de ativar *in vivo* químicos exógenos. Apesar do seu papel biológico não se encontrar totalmente esclarecido, a sua ampla distribuição por quase todos os seres vivos sugere um papel crucial no metabolismo celular (79,90).

1.3.2. Reações que envolvem o sistema citocromo P450 – Fase I de biotransformação

A descoberta do sistema citocromo P450 ocorreu na primeira metade do século XX quando se estudavam reações onde o dioxigénio era utilizado como substrato. Nesse processo um dos átomos da molécula de dioxigénio combinava-se com o hidrogénio proveniente do coenzima NADPH para gerar água, sendo o segundo átomo de oxigénio incorporado num substrato orgânico, sobre o qual o enzima exercia a sua ação, como é ilustrado pela equação (57,79,80,91–96):



Essas reações, originalmente denominadas por “monoxigenases de função mista”, foram detetadas na fração microsomal hepática de coelho onde esteroides, produtos farmacêuticos e fitofarmacêuticos constituíram alguns dos substratos reconhecidos (80,91–93). A identificação dos componentes moleculares do sistema citocromo P450 presentes no retículo endoplasmático liso incluiu a descoberta de uma hemoproteína com capacidade para reconhecer o monóxido de carbono como ligando e formar um cromóforo, cujo espectro de absorção exibia um máximo característico a 450 nm de cor vermelha (97). Outro passo importante relacionado com a caracterização do referido sistema prende-se com a descoberta de que essa proteína, ou melhor uma panóplia de isoenzimas usualmente designados por citocromo P450, comportava-se como constituinte terminal de uma cadeia de transporte de eletrões, localizada no retículo endoplasmático liso e era capaz de catalisar a modificação química de diferentes substratos (97). A classificação sistemática dos citocromos P450 foi proposta pela primeira vez por Nebert (1989) que os agrupou por famílias e subfamílias homólogas, tendo como ponto de partida a estrutura primária dos respetivos cDNA (98). Mais tarde, a nomenclatura hoje utilizada, foi revista e atualizada (98). Os citocromos P450

resultam de uma vastíssima quantidade de genes, cuja expressão é condicionada pelo estágio de desenvolvimento do indivíduo, pela identidade ou fenótipo do tecido em causa, bem como pela ação de agentes reguladores, tanto endógenos como exógenos. Alguns autores argumentam que todos os membros da superfamília P450 derivam de um gene ancestral comum que ter-se-á constituído há mais de 3,5 biliões de anos. Como referido no sub-capítulo 1.2, a sua expressão está sujeita a mecanismos complexos de regulação ao nível molecular. O facto de muitos genes que codificam citocromos P450 poderem ser induzidos e/ou reprimidos por sinais químicos ambientais, confere a estas monoxigenases uma função biológica de defesa sensorial contra compostos de baixo peso molecular, uma importante interface bioquímica dos organismos vivos com o meio ambiente (57). O sistema citocromo P450 ocupa assim um lugar cimeiro em termos de versatilidade catalítica e da quantidade elevada de xenobióticos que desintoxica ou ativa em intermediários reativos. Os citocromos P450 encontram-se agrupados em famílias de isoenzimas que exibem pelo menos 40% de homologia sequencial. Por vezes, essas famílias encontram-se subdivididas em subfamílias onde os respetivos membros apresentam uma quantidade de sequências homólogas superior a 60%. Cada enzima ou mRNA codificante pode ser identificado pelo prefixo CYP, seguido por um número, por uma letra e por outro número, codificação que os liga à família e subfamília a que pertencem (79,80).

Os enzimas citocromo P450 encontram-se ubiquamente distribuídos pelos seres vivos, ocorrendo em bactérias, fungos, plantas e animais. Atingem o nível de expressão mais elevado no retículo endoplasmático hepático de todos os animais, embora possam ser detetados em menor extensão noutros tecidos e mitocôndrios hepáticos (79,80,99).

As reações catalisadas pelo sistema citocromo P450 do retículo endoplasmático, envolvem a transferência de eletrões do coenzima NAD(P)H para esse sistema por processos mediados pelos enzimas NADPH citocromo (P450) redutase (CPR) e/ou citocromo b5 redutase (B5R) (99), onde as hemotiolatoproteínas funcionam como terminais de cadeias de transporte de eletrões localizadas no retículo endoplasmático (79,80,99):



O ciclo catalítico inicia com a ligação do substrato (RH) ao átomo férrico do hemo do citocromo P450 (Figura 1.7). A ligação do substrato ao centro catalítico induz uma alteração conformacional do enzima que facilita a redução do átomo de ferro, por transferência de um eletrão do coenzima NADPH, catalisada pela flavoproteína CPR. O átomo de ferro no estado

ferroso liga-se então ao dioxigénio dando origem a um complexo Fe^{2+} -dioxigénio que aceita um segundo eletrão do coenzima NADH, mediado pelo enzima B5R ou do coenzima NADPH, mediado pelo enzima CPR. Posteriormente dá-se a transferência dos dois eletrões para o oxigénio. Um desses átomos é incorporado no substrato após formação do complexo intermediário $[\text{FeO}]^{3+}$, um oxeno de Fe^{4+} , formalmente equivalente ao catião radicalar porfirínico $-\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, enquanto o segundo átomo de oxigénio é reduzido a água. A libertação do substrato oxidado regenera o estado de oxidação do átomo de ferro do CYP (Figura 1.7) (79,100).

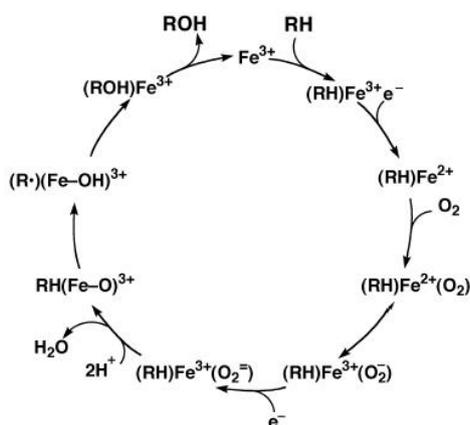
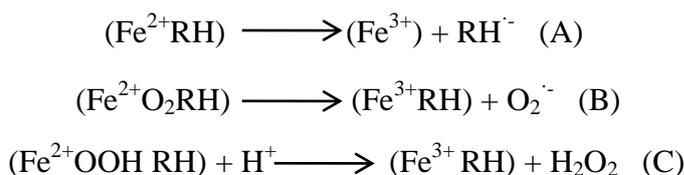


Figura 1.7 - Ciclo de reação que envolve a participação do sistema P450 na monoxigenação do substrato, onde Fe representa o átomo de ferro hémico (adaptado de Coon, 2002) (101,102).

A sequência de aminoácidos na vizinhança do resíduo de cisteína que estabelece a ligação entre o grupo tiolato e o hemo é fortemente conservada em todos os enzimas citocromo P450. Quando esta ligação é interrompida, o citocromo P450 é convertido numa forma cataliticamente inativa denominada citocromo P420 que pode ser detetada por espectrometria de absorção molecular (99,103,104).

Se o ciclo catalítico (Figura 1.7) for interrompido, o oxigénio é libertado sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS), como a espécie radicalar, o anião superóxido ou o peróxido de hidrogénio. Por outro lado, o funcionamento excessivo do próprio ciclo catalítico pode gerar outras espécies reativas (101,102,105):



O sistema citocromo P450 catalisa diferentes tipos de reações, entre os quais se destacam a hidroxilação de carbonos alifáticos ou aromáticos, a epoxidação de ligações

duplas, a oxigenação e hidroxilação de heteroátomos (S-, N- e I-), desalquilação de heteroátomos (O-, S-, N- e Si-), transferência oxidativa de grupos funcionais, de desidrogenação e de clivagem de ésteres (100,105).

No mitocôndrio, o sistema citocromo P450 catalisa a biossíntese de hormonas esteroides e da vitamina D3. Neste organelo, a transferência de eletrões da coenzima NADPH para citocromos P450 envolve dois enzimas distintos dos microsossomais: a flavoproteína ferredoxina redutase e a ferredoxina, uma proteína com centros de ferro/enxofre de acordo com o diagrama:



A caracterização de genes CYP de Anquiliformes, Cypriniformes e Petromyzontiformes tem decorrido de forma intensiva nas últimas duas décadas. A deteção da expressão funcional de citocromos P450 específicos tem sido utilizada em estudos fundamentais de biologia marinha e na monitorização de animais marinhos expostos a contaminantes ambientais (80,106). Em animais pertencentes a estas ordens, foram identificados 137 genes que codificam citocromos P450. Esses genes foram agrupados por 18 famílias: CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5, CYP7, CYP8, CYP11, CYP17, CYP19, CYP20, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46 e CYP51. A expressão de muitas dessas formas isoenzimáticas de citocromos P450 foi predominantemente detetada no tecido hepático (106). Diversos estudos demonstraram ainda que a isoforma CYP1A constitui um bom biomarcador de poluição aquática por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e dioxinas, sendo as atividades etoxicumarina *O*-desetilase (ECOD), etoxiresorufina *O*-desetilase (EROD), e 7-benziloxiresorufina *O*-desetilase frequentemente utilizadas na deteção da expressão funcional de citocromos P450 da família 1A, como indicadores de contaminação ambiental. A atividade ECOD tem sido considerada marcadora da expressão funcional dos CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2E1, e CYP2E6 de mamíferos (107). As famílias de CYP de espécies piscícolas que reconhecem a 7-etoxicumarina como substrato ainda não foram definitivamente identificadas. No entanto, esta reação é catalisada aparentemente em *Oncorhynchus mykiss* pelo CYP1A (108). Os CYP1A, e em particular os CYP1A1, funcionam como sistemas de desintoxicação omnipresentes em quase todos os organismos vivos sendo particularmente sensíveis a uma vasta gama de contaminantes orgânicos que vai para além dos AH e das dioxinas, englobando por exemplo, compostos

policlorados bifenílicos (PCBs), descritos como muito persistentes no ambiente, metais, medicamentos, produtos fitofarmacêuticos ou produtos do metabolismo secundário das plantas (109). Entre os diversos indutores das atividades ECOD e EROD em espécies piscícolas distinguem-se o Aroclor 1254, uma mistura de PCBs (110) e a β -naftoflavona em *Oncorhynchus mykiss* (111), bem como o 3-metilcolantreno e PCBs em *O. niloticus* e *O. aureus* (112). Este tipo de resposta não só deteta contaminação ambiental, mas permite ainda prever efeitos moleculares responsáveis pela ocorrência de distúrbios fisiológicos adversos (113). Esse tipo de compostos induz a expressão funcional do CYP1A comportando-se como ligandos do complexo AhR que induz a transcrição do referido gene, com conseqüente aumento dos níveis de mRNA do CYP1A, algumas horas após a exposição (114). Por esse motivo, alterações do nível de expressão do gene CYP1A como os que foram detetados em *Tremetomus bernacchii* têm sido utilizados como biomarcadores na monitorização de contaminantes orgânicos (115). Todavia, alguns autores sugerem um papel constitutivo adicional para as subfamílias que catalisam a atividade ECOD, uma vez que esta, em algumas espécies piscícolas, como o *Ictalurus punctatus*, pode ser detetada em níveis elevados mesmo quando não ocorre indução do CYP1A (116).

A importância do biomarcador CYP1A tem sido demonstrada em estudos de campo com *Salmonidae* e *Mugilidae* expostos a PCBs (112,113), entre outros. Embora a indução da expressão do CYP1A não forneça informações detalhadas sobre a estrutura química do poluente ou o nível de exposição, indica que se trata de um composto aromático planar e aponta para o seu possível impacto na saúde animal (54,119). Além disso, alterações nos níveis de expressão do CYP1A podem servir como medidas de exposição a longo prazo, pelo que a deteção da indução de CYP1A tem aumentado nos últimos anos graças à otimização de protocolos que facilitam a determinação rápida de atividades catalíticas como a EROD e a ECOD fornecendo uma “impressão digital molecular” relativa ao contacto de animais com compostos AhR-ativos (79,119,120). Assim a indução de atividades catalíticas desetilases mediadas pelos CYP1A constitui um indicador extremamente sensível de alterações ambientais, sendo em geral uma das primeiras respostas detetáveis e quantificáveis após a exposição. Por outro lado, as atividades ECOD e EROD representam o impacto cumulativo de vários produtos químicos que induzem e são ou não detetados analiticamente (75,116). Tal como acontece com a maioria dos fenómenos biológicos, essas atividades catalíticas podem ser influenciadas pelo tipo de tecido de um determinado organismo e pela enorme variedade de fatores biológicos, ambientais e temporais. Os fatores biológicos que podem influenciar as atividades ECOD e EROD incluem a espécie, o tamanho, a idade e o estágio de

desenvolvimento do animal (79,119,121). Os fatores ambientais que podem afetar os níveis de atividade ECOD e EROD incluem as condições de acondicionamento físico dos animais nos tanques do laboratório ou alterações da composição química, salinidade, pH e temperatura do habitat nos ensaios de campo. Condições ambientais, como temperatura, salinidade e pH devem ser determinadas por rotina ao longo de qualquer estudo uma vez que podem afetar drasticamente a indução das atividades ECOD e EROD (79,119,121). A literatura recomenda ainda que o período de exposição a um determinado contaminante ambiental, a duração do estudo, a dieta e o tipo de anestesia a aplicar deverão ser adequadamente padronizados e controlados em ensaios de laboratório (79,119).

Até ao momento, têm decorrido muitos ensaios de campo onde se determinaram as atividades ECOD e EROD para estimar a tendência espacial e temporal de contaminação em sistemas aquáticos (119). Estes estudos têm detetado a indução da atividade desetilase em muitas espécies piscícolas de diferentes habitats. Esta extensa validação dessa atividade catalítica como biomarcador conduziu à sua utilização em vários programas de monitorização de contaminantes por todo o mundo (120,122). A indução do CYP1A, não corresponde sempre a uma resposta tóxica, embora a geração de intermediários reativos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pelos CYP1A constitua em muitos casos uma fonte de aductos de DNA implicados em processos de tumorigénese. Além disso, efeitos na capacidade reprodutora, por diminuição dos níveis séricos de hormonas esteroides, o aumento do índice hepato-somático e a mortalidade acrescida de espécies piscícolas têm sido associados à indução das atividades ECOD e EROD (119,121). Contudo, a quantidade elevada de sintomas e efeitos que os diversos ligandos do complexo AhR exercem sobre vários processos bioquímicos, têm tornado difícil a identificação de eventos críticos que conduzam à toxicidade. Por esse motivo, alterações nas atividades ECOD e EROD de espécies piscícolas têm sido apenas consideradas como bons indicadores de exposição a contaminantes ambientais, uma vez que nem sempre é fácil estabelecer uma ligação direta entre a indução do CYP1A e os efeitos prejudiciais nesses animais (121). O aumento de informação que relacione alterações nas atividades ECOD e EROD com efeitos prejudiciais em espécies piscícolas poderá vir a ser uma ferramenta útil na previsão de risco de exposição a poluentes (79,119,121,123).

A biotransformação sequencial de um substrato pode ser bietápica. Em geral, é precedida pela absorção, processo pelo qual os xenobióticos atravessam as membranas celulares e alcançam a corrente sanguínea (67,79). Os principais locais de absorção em espécies piscícolas são as brânquias, o sistema digestivo e a pele. Como descrito

anteriormente, a Fase I envolve maioritariamente a hidrólise de ligações químicas, a oxidação/redução ou a substituição de grupos funcionais mediadas maioritariamente pelo sistema citocromo P450, como ilustrado na Figura 1.8 (67,79,113,124).

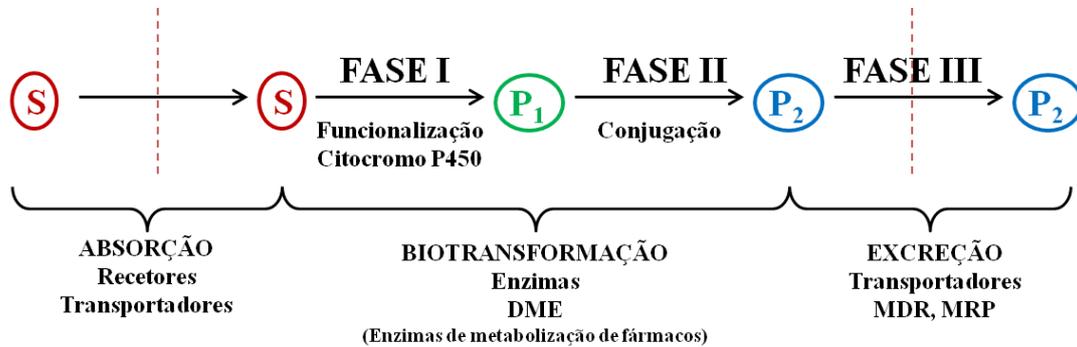


Figura 1.8 - Biotransformação bietápica de xenobióticos (adaptado de Klaassen e Quintas) (79,125).

A Fase II que corresponde ao conjunto de reações usualmente descritas por conjugação intervém no metabolismo de um xenobiótico dando continuidade às reações de oxidação da Fase I, ou modificando diretamente um substrato portador de grupos oxidrilo, tiol ou ácido carboxílico. Estas reações podem ser catalisadas por enzimas de membrana ou citoplasmáticos com capacidade para reconhecer co-substratos como o ácido glicurónico, o tripéptido glutationo ou diversos sulfatos. Entre os enzimas de biotransformação destacam-se a UDPGT e a GST (60,78). Os níveis de atividade e a resposta a xenobióticos por enzimas da Fase II de biotransformação são, em geral, menos pronunciados do que a dos enzimas da Fase I (78). A Figura 1.9 mostra de forma esquemática como os enzimas de biotransformação podem atuar de diferentes formas sobre o substrato.

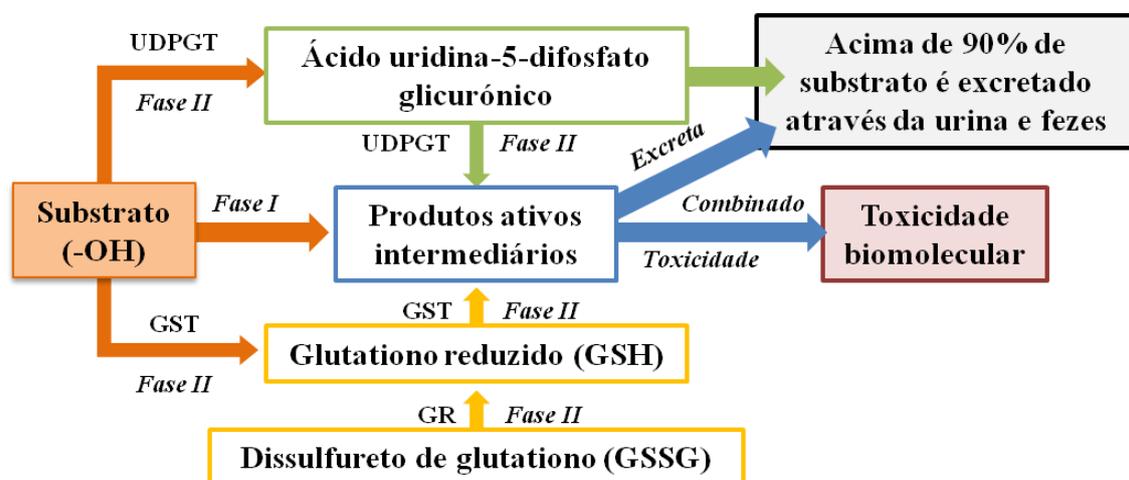
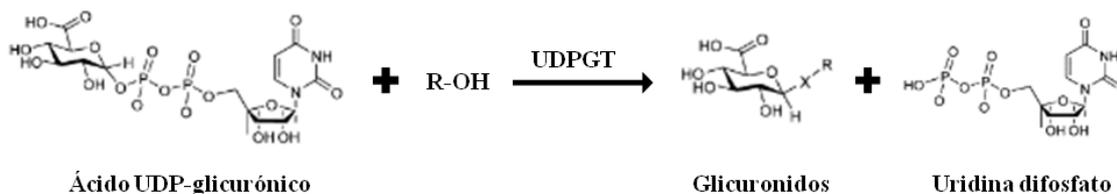


Figura 1.9 - Consumo de substratos exógenos/endógenos por enzimas de biotransformação (adaptado de Yang, 2013) (126).

A biotransformação conduz, em geral, à desintoxicação e eliminação de xenobióticos de um determinado organismo. Contudo, o sistema citocromo P450 pode ativar compostos pouco reativos, tornando-os citotóxicos, mutagênicos e/ou cancerígenos. Por exemplo, algumas atividades do sistema citocromo P450 e UDPGT de *Platycephalus bassensis* aumentaram significativamente após exposição a uma mistura de PCBs, enquanto as atividades UDPGT de *Salmo gairdneri* diminuíram significativamente após exposição a diversos fenóis policlorados (78).

1.3.3. Reações de conjugação – Fase II de biotransformação

O termo uridina-difosfato glicuronosiltransferases (UDPGT) designa um grupo extenso de isoenzimas estreitamente relacionados que catalisam a transferência de uma molécula de ácido glicurônico ativada para álcoois aromáticos e alifáticos, ácidos carboxílicos, aminas e grupos sulfidrilo livres de compostos exógenos, levando à formação de conjugados *O*-, *N*- e *S*- glicurônidos (60):



Em termos metabólicos e quantitativos, corresponde à reação de conjugação mais importante dos mamíferos, sendo detetada em quantidade elevada na urina ou na bÍlis desses animais. A maior solubilidade dos conjugados glicurônidos facilita a eliminação dos compostos de origem pelos fluidos biológicos. Os enzimas UDPGT expressam-se no retículo endoplasmático, contrariamente ao que acontece com muitos enzimas da Fase II de biotransformação que possuem localização citoplasmática (60,126).

As reações de glicuronidação parecem estar restringidas aos vertebrados, não tendo sido ainda identificadas em invertebrados ou em plantas onde a glicosilação é utilizada em reações análogas de desintoxicação. Assim, parece relevante do ponto de vista evolutivo detetar e caracterizar UDPGT de organismos ancestrais como as espécies piscícolas, os organismos mais “primitivos” com capacidade para catalisar esse tipo de reações, para os quais constituem uma via relevante de desintoxicação de poluentes orgânicos (127). Os estudos relacionados com esta via de biotransformação em espécies piscícolas tem sido predominantemente dirigidos para avaliar o potencial desses animais para lidar com poluentes

orgânicos, uma vez que nas linhas de costa e nos estuários das principais regiões industrializadas do globo, aumentam diariamente os níveis de contaminação ambiental por uma ampla variedade de detritos químicos (60).

O termo glutathione *S*-transferase (GST) designa uma família multifuncional de enzimas cujas atividades enzimáticas maioritariamente citoplasmática foram detetadas pela primeira vez em 1961, por Booth e colaboradores, investigadores do Instituto Chester Beatty, em South Kensington, quando se dedicavam ao estudo do cancro. Contudo, as primeiras tentativas de purificação deste tipo de enzimas não foram bem-sucedidas devido à multiplicidade de isoenzimas que se expressam em diferentes seres vivos e à especificidade sobreponível que apresentam para diferentes substratos. O seu papel biológico consiste em combinar o tripéptido glutathione (GSH) com compostos eletrófilos através de uma ligação dissulfureto, contribuindo para aumentar a sua hidrofiliidade e facilitar a sua metabolização e eliminação, de acordo com a equação (128–130):



onde RX representa o composto eletrófilo, GSH o glutathione (γ -Glu-Cys-Gly) e RSG o conjugado resultante do processo. Em geral, os substratos hidrófobos dos enzimas GST possuem um átomo de carbono eletrófilo e são capazes de reagir não enzimaticamente com o tripéptido a uma taxa razoavelmente mensurável. O tamanho molecular varia desde pequenas moléculas como o diclorometano até hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de grandes dimensões como o benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido (131,132). Apesar do ataque nucleófilo que os enzimas GST exercem preferencialmente sobre substratos com átomos de carbono eletrófilos, como os haletos de alquilo e de arilo, as lactonas, os epóxidos, as quinonas, os ésteres e alcenos ativados, compostos com átomos de azoto eletrófilos como os ésteres azotados, ou com átomos de enxofre como os tiocianatos orgânicos e dissulfuretos, ou com átomos de oxigénio como os lipoperóxidos, também podem servir como alvos alternativos (67,133). A resorufina, um dos produtos da atividade EROD é utilizado como substrato de reações da Fase II em que participam UDPGT e GST. A atividade glutathione *S*-transferase é habitualmente determinada recorrendo-se a substratos de referência, tais como 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (123,134,135).

Os enzimas GST podem ser agrupados de acordo com as suas propriedades físicas, catalíticas, reatividade cruzada com anticorpos e análise sequencial dos diferentes isoenzimas em 7 classes: α , μ , π , θ , ξ e κ citoplasmáticas e uma classe distinta no retículo

endoplasmático (128,136,137). Do ponto de vista estrutural, os enzimas citoplasmáticos podem existir como homo ou heterodímeros, organizando-se como homotrímeros no retículo endoplasmático. Em qualquer dos casos cada subunidade possui dois centros ativos e dimensão molecular entre 24000 e 28000 (136). Estas famílias de isoenzimas têm sido extensivamente estudadas e caracterizadas em roedores, na espécie humana e em espécies piscícolas. Apesar de terem sido detetados e purificados GST hepáticos e extra-hepáticos como as brânquias de diversas espécies piscícolas, em teleósteos existe pouca informação disponível, relativa à caracterização molecular e ao papel dos isoenzimas GST. Contudo, diversos autores observaram que o nível de expressão de GST em muitas espécies piscícolas altera-se significativamente após exposição desses animais a compostos exógenos (123,128,132,136–139).

O aumento de atividade GST hepática de uma determinada espécie piscícola pode deste modo indicar que um xenobiótico particular poderá estar a ser metabolizado por conjugação com o GSH e/ou indicar apenas a presença desse composto particular no habitat dessa espécie, razão pela qual este enzima pode ser considerado como bom biomarcador de exposição a poluentes ambientais (128,136,139,140).

Os enzimas UDPGT e GST medeiam assim vias de desintoxicação celular e de excreção de xenobióticos que desempenham um papel fulcral na aquisição de resistência celular a produtos farmacêuticos e fitofarmacêuticos, bem como a outros agentes eletrófilos de circulação ambiental, combinando-os com moléculas endógenas, tais como o ácido glicorónico ou o glutationo, processos que facilitam a sua posterior eliminação do organismo (101,136,140).

A atividade GST tem sido determinada tanto em espécies piscícolas cartilagueas como ósseas sendo o CDNB reconhecido como substrato preferencial de quase todos os isoenzimas (121,139,144).

Este quadro de respostas tem permitido atribuir a estes enzimas um papel de relevo nos mecanismos moleculares adaptativos ao *stress* químico, legitimando a sua utilização como biomarcadores de contaminação aquática, pelo que urge caracterizar a sua resposta a contaminantes ambientais, para que se possa otimizar a sua utilização na previsão, no diagnóstico e no controlo da poluição (121,128,140,141). Algumas das abordagens bioquímicas deste trabalho relativas a enzimas de biotransformação, incluindo GST citoplasmáticas e do retículo endoplasmático de fígado de lampreia, poderão constituir um primeiro passo para estabelecer a sua utilização como biomarcador ecotoxicológico (60,121,123,139,142,143).

Os níveis de atividade GST dependem também de fatores nutricionais. Como a lampreia é um organismo hematófago, a atividade enzimática basal pode ser afetada pela presença de indutores no sangue de outras espécies piscícolas de que se alimentam, tal como previamente relatado por Vindimian (1991) (121,145,146). Contudo neste estudo esse problema não se colocou uma vez que os indivíduos selecionados foram exemplares de lampreia-marinha recém-metamorfoseados, mantidos em jejum durante o estudo. Poderão antes refletir o contacto com poluentes presentes nas bacias de origem, aos quais poderão ter sido expostos enquanto filtradores.

Para além do papel relevante na biotransformação de xenobióticos, os enzimas GST intervêm ainda no transporte intracelular e na defesa contra o *stress* oxidativo e em particular contra a peroxidação lipídica (121,128,139,147).

1.3.4. Reações da Fase III de biotransformação

A literatura considera repetidas vezes que um xenobiótico após a Fase II encontra-se desintoxicado e como tal deixa de ter relevância biológica. Contudo, a acumulação de derivados metabólicos na célula, eventuais causadores de danos celulares ou a sua excreção assumem particular importância na designada Fase III de biotransformação. Assim, essa fase inclui enzimas de desintoxicação envolvidos na eliminação de produtos das Fases I e II, via transporte transmembranar, mediado por glicoproteínas P (PGPs) ou por proteínas associadas à resistência múltipla a drogas (78,148).

A primeira PGP, designada por proteínas de resistência múltipla a drogas (MDR) foi descoberta em 1976 quando se realizavam estudos de resistência à quimioterapia (149). Esse tipo de proteínas transporta uma quantidade elevada de compostos com estrutura e modo de ação diferentes. Kurelec (1992) demonstrou que proteínas envolvidas na resistência múltipla a xenobióticos (MXR) possuíam semelhanças estruturais com as MDR. A ampla distribuição taxonómica das proteínas MXR, bem como a indução da sua expressão após exposição a xenobióticos, revelam a sua importância em mecanismos de defesa celular não específicos (78,149). Os mecanismos pelos quais a célula expelle os poluentes ainda não são conhecidos. Estudos realizados por Kurulec (1995) revelaram que o sistema MXR do molusco *Monodonta turbinata* pode ser induzido por hidrocarbonetos enquanto o de *M. edulis* é capaz de expelir produtos fitofarmacêuticos como as triazinas (78,148).

Outros organismos aquáticos resistentes a contaminantes ambientais expressam acima da média de componentes dos sistemas de transporte da Fase III quando são expostos a compostos organoclorados (78,149). A existência de xenobióticos sensibilizadores capazes de

inibir proteínas MDR ou MXR e de promover o aumento da concentração intracelular de poluentes, bem como a ocorrência de danos celulares encontra-se também descrita na literatura por diversos autores. Assim, os sistemas de transporte que envolvem proteínas da Fase III podem ser considerados como reguladores da biodisponibilidade de contaminantes intracelulares, sendo por esse motivo, tão relevantes na desintoxicação celular como os processos que decorrem nas fases I e II (78,119,121,149,150).

Ao longo da vida, os animais apresentam alterações metabólicas que frequentemente se traduzem por perfis de expressão diferenciados dos sistemas de biotransformação de xenobióticos, pelo que a fase do crescimento em que o animal se encontra, bem como fatores abióticos, nos quais se incluem a temperatura e a salinidade, influenciam a resposta adaptativa a alterações químicas no seu habitat (78,115,151,152). Por exemplo, os teleósteos na Fase inicial da vida são mais sensíveis ao *stress* salino do que os indivíduos na fase adulta (41,153). A transferência direta do meio marinho para o meio dulçaquícola de *Oryzias javanicus*, uma espécie piscícola com sistema de adaptação osmótico único e larga tolerância à salinidade, provocou a indução do CYP1A branquial, facto que aponta para a importância da salinidade na capacidade de resposta pelos sistemas de biotransformação (39). Salmonídeos, como a truta arco-íris, expostos a choque salino manifestaram uma indução da expressão funcional do CYP3A (154).

Os estudos que procuram avaliar a influência das alterações de salinidade sobre a capacidade de resposta dos sistemas de biotransformação de espécies piscícolas, decorrem em laboratório, maioritariamente em tanques onde é construído um gradiente de salinidade finamente controlado que simula as condições de migração entre o meio dulçaquícola e o meio marinho (153,155), na ausência e/ou na presença de um ou mais xenobióticos (45,156). A adaptação ao ambiente salino ou dulçaquícola depende de espécie para espécie. Lavado (2013) num estudo de aclimação ao sal que realizou com a espécie anádroma *Oncorhynchus kisutch*, constatou que a eliminação de xenobióticos por enzimas da Fase I de biotransformação, em termos de conteúdo em CYP e atividade FMO eram afetados por estímulos ambientais, como a salinidade que condicionavam a toxicidade de xenobióticos da família dos compostos organofosforados e tiocarbamatos, durante a aclimação à água salgada de indivíduos da espécie *Oncorhynchus kisutch* (46).

Em geral, todas as espécies anádromas, em particular a *Petromyzon marinus* (157) e o *Oncorhynchus kisutch* (46) são mais sensíveis a alterações das condições ambientais pela migração característica que realizam entre os meios dulçaquícola/marinho, e vice-versa, ou

pela presença de xenobióticos, despoletando respostas, na maior parte dos casos adaptativas a fatores abióticos do seu habitat.

1.3.5. Agentes bi e monofuncionais

Existem dois tipos de agentes químicos com capacidade para despoletar reações de biotransformação: os indutores bi e monofuncionais. Os indutores bifuncionais incluem compostos como a β -naftoflavona, o benzo[a]pireno, o 3-metilcolantreno e a TCDD ou dioxina, que induzem enzimas de Fase I (tais como o CYP1A1) e enzimas de Fase II (tais como UDPGT e GST) (101,121,136). Estes agentes podem exercer a sua ação recorrendo a dois mecanismos distintos, um envolvendo elementos de resposta a xenobióticos (XRE) e outro envolvendo elementos de resposta antioxidante (ARE). Os elementos de resposta correspondem a sequências curtas de DNA, reconhecíveis por fatores de transcrição que controlam a expressão génica, muitas vezes localizadas na região 5' a montante da região codificante. A expressão de alguns enzimas, como os CYP1A1, é maioritariamente regulada por sequências XRE, ao passo que a dos enzimas GST, são regulados por sequências ARE. Existem ainda outros enzimas, como a DT-diaforase, cuja expressão é regulada pelos dois mecanismos (158,159). Os agentes químicos que modulam a expressão génica via sequências XRE fazem-no por ligação ao complexo Ah. Contrariamente aos agentes bifuncionais, os agentes monofuncionais não reconhecem o complexo AhR e como tal não se comportam como indutores do CYP1A. No entanto, os agentes monofuncionais, tal como os agentes bifuncionais são capazes de induzir a expressão funcional de enzimas da Fase II, maioritariamente regulada pelas sequências ARE, incluindo a diaforase. Como alterações na expressão génica de UDPGT e GST podem estar ou não correlacionadas com a indução dos CYP, a sua deteção pode permitir detetar efeitos complementares aos que estão associados aos CYP, caso seja exclusivamente modulada pela interação com sequências ARE (158–160).

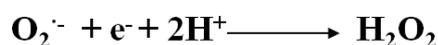
Os agentes monofuncionais podem ser subdivididos em duas classes: (i) os que podem despoletar *stress* oxidativo por ciclos de oxidação-redução, como acontece com as quinonas, a menadiona, e os antioxidantes fenólicos ter-butil-hidroquinona e 3,5-di-ter-butylcatecol e (ii) aqueles que causam *stress* oxidativo por redução do glutatióno com acontece, por exemplo, com fumaratos, maleatos, acrilatos, isotiocianatos, e outros aceitadores de Michael que reagem com o tripéptido (159).

1.4. *Stress* oxidativo

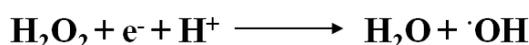
A célula como unidade básica da vida dispõe de uma organização estrutural e funcional cujo desempenho harmónico depende da compartimentação celular, assegurada por fronteiras moleculares como a membrana citoplasmática, o retículo endoplasmático ou sistemas membranares mitocondriais e peroxissomais. O metabolismo energético e a biotransformação de xenobióticos constituem as principais fontes de espécies reativas de oxigénio (ROS) na célula eucarionte. Pulsos pontuais de ROS exercem efeitos benéficos nos organismos vivos, uma vez que atuam como mensageiros químicos em vias de sinalização celular. Contudo, a célula entra em *stress* oxidativo quando ocorre um aumento crónico dos seus níveis de ROS (102–104,147).

Em termos químicos, o *stress* oxidativo pode ser descrito como uma acentuada transição redutor-oxidante do ambiente celular, maioritariamente assegurado por pares redox como GSH/GSSG, NADH/NAD⁺ ou tiorredoxina_{red}/tiorredoxina_{ox}. Pode-se dizer então que as consequências do *stress* oxidativo na sobrevivência celular dependerão da extensão do deslocamento desses equilíbrios. Em geral, a célula dispõe de mecanismos moleculares que lhe permitem superar efeitos pontuais que perturbem o saudável equilíbrio redox. No entanto, perturbações em maior escala podem provocar danos em biomoléculas como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, capazes de levar à morte celular (102–105,161,162).

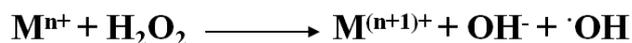
O radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), os organoperóxidos (ROOH), os radicais alcóxido (RO^{\cdot}) e peróxido (ROO^{\cdot}) destacam-se entre as espécies reativas de oxigénio que se podem formar na célula eucarionte (102,104,105,163). A maior parte do peróxido de hidrogénio gerado nos organismos vivos tem a sua origem na dismutação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, de acordo com a reação (105):



Como o H_2O_2 não é um radical, é muito mais estável em meio aquoso e comporta-se como oxidante mais fraco do que o $\text{O}_2^{\cdot-}$, pode ser enzimaticamente transformado em água e dióxigénio (163). No entanto, o H_2O_2 converte-se no radical hidroxilo de acordo com (105):



uma espécie fortemente reactiva e tóxica quando em presença de metais de transição, como o ferro ou o cobre. O radical $\cdot\text{OH}$ forma-se *in vivo* através da redução de H_2O_2 pelo radical anião superóxido, via reacção de Fenton de acordo com:



ou de Haber-Weiss de acordo com:



processos catalisados por metais de transição (102,164). O radical $\cdot\text{OH}$ pode modificar aminoácidos levando, por exemplo, à formação de orto- e meta-tirosina a partir de fenilalanina, pode iniciar peroxidação lipídica e oxidar glúcidos e bases azotadas (102–105). Alguns compostos orgânicos, como as quinonas, também podem gerar ROS através de ciclos de oxidação-redução com os seus conjugados semiquinonas e hidroquinonas, e consequente levar à formação de $\cdot\text{O}_2^-$ a partir do O_2 ou de H_2O_2 a partir do radical $\cdot\text{O}_2^-$ (105,163).

Os sistemas biológicos possuem uma ampla variedade de mecanismos de defesa antioxidativos para prevenir e combater alterações do ambiente redutor celular, sendo alguns dos quais caracterizados no seguimento deste texto.

O glutathione (GSH) é um tripéptido de baixo peso molecular maioritariamente detetado em fungos, animais e plantas, cuja concentração intracelular pode variar entre 0,1 e 10 mM (102,104). Trata-se de um tiol não-proteico que participa num sistema tampão de oxirredução, com papel relevante na defesa antioxidante da célula. Enquanto antioxidante, está envolvido na captura de ROS, como o radical $\cdot\text{OH}$, na redução do H_2O_2 e na doação de potencial redutor a reacções catalisadas pelo enzima glutathione peroxidase. Como co-substrato dos enzimas GST participa na metabolização de xenobióticos, cujos derivados são excretados pela via dos mercapturados (99,102,104,165). Assiste ainda a funções celulares como a síntese de DNA e proteínas. O excesso de ROS intracelular pode em muitos casos ser consumido por reacção directa ou enzimática com o GSH que se converte na forma dimérica de dissulfureto de glutathione (GSSG), processo que é seguido pela diminuição da razão GSH/GSSG, alteração que é frequentemente utilizada como indicador da ocorrência de *stress* oxidativo. Por esse motivo, a manutenção de níveis intracelulares de GSH que maximizem a razão GSH/GSSG, torna-se indispensável para assegurar um saudável ambiente redutor

celular nos organismos que usualmente se expõem a condições ambientais hostis, prevenindo assim a ocorrência de *stress* oxidativo (102,104,166).

Alternativamente ao GSH, as estruturas químicas de baixo peso molecular como o ascorbato, o β -caroteno e o α -tocoferol, ou enzimas como glutationato redutase (GR), glutationato peroxidase (GPx) e glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), direta ou indiretamente envolvidos no ciclo de oxidação-redução do GSH, ou ainda superóxido dismutases (SOD) e catalases (CAT) desempenham também um papel relevante na estabilização do ambiente redutor intracelular. Alterações dessas atividades enzimáticas antioxidativas são consideradas por diversos autores como bons indicadores da susceptibilidade celular para o *stress* oxidativo (102,104,167,168).

O enzima GR desempenha um papel essencial na manutenção da capacidade antioxidante celular, uma vez que recicla o GSSG em GSH, utilizando equivalentes redutores sob a forma de NADPH gerados pela via redutora das pentoses fosfato, ao nível do seu enzima regulador G6PD. Diversos estudos têm revelado que o enzima GR pode sofrer inativação/ativação na presença de vários agentes redutores ou oxidantes. Um desses exemplos é o coenzima NADPH que ao ser pré-incubado com esse enzima antes da adição de GSSG inativa-o reversivelmente. O varrimento da resposta antioxidante celular envolve ainda a determinação de perfis de outras atividades antioxidativas como SOD, GPx e CAT (Figura 1.10) (99,102,169,170).

Como referido anteriormente, o enzima-chave da via das pentoses fosfato designa-se por G6PD, uma fonte maioritária de equivalentes redutores sob a forma de NADPH. O défice metabólico deste enzima tem sido correlacionado com efeitos patológicos, devido ao bloqueio do ciclo do glutationato. Os enzimas antioxidativos CAT e GPx desempenham um papel importante na proteção dos organismos vivos contra o *stress* oxidativo despoletado por peróxidos, podendo ser detetados em todos os tecidos de vertebrados, mas expressando-se em maior extensão no fígado, órgão importante na absorção de xenobióticos e consumo enzimático de ROS (Figura 1.10) (171). Estes enzimas podem assim constituir bons bioindicadores moleculares sobre o *stress* oxidativo mediado por contaminantes, podendo ainda indicar a magnitude da resposta em populações cronicamente expostas a contaminantes tais como metais e outros xenobióticos (102,172,173).

O enzima GPx é uma seleno-proteína que manifesta elevada eficiência catalítica sob peróxidos e lipoperóxidos, reduzindo-os a água ou ao álcool correspondente, utilizando glutationato como doador de equivalentes redutores. Em geral, respondem de forma alternativa ou complementar à ação de CAT, outro conjunto de enzimas antioxidantes que exercem

resposta antioxidante primária. Os enzimas CAT são hemoproteínas com distribuição ubíqua na natureza, organizados sob o ponto de vista estrutural como homotetrâmeros, cujos protómeros dispõem de um núcleo protoporfirínico IX com um átomo de ferro, vulgarmente conhecido por hemo que constitui o seu grupo prostético. Desempenha um papel relevante na desintoxicação do peróxido de hidrogénio reduzindo-o a água. Os enzimas catalase tem localização citoplasmática, como acontece com os CTT1, e peroxissomal como é o caso dos CTA1. A montante das peroxidases encontram-se usualmente os enzimas SOD cujo papel biológico, como a sua designação sugere, é dismutar o radical $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 , minimizando assim os efeitos nocivos desse radical. McCord (1974) descobriu que o hialuronato de sódio protege a célula contra a despolimerização por radicais livres e revelou que a administração exógena de SOD pode ter um efeito anti-inflamatório (174). O radical $\cdot\text{O}_2^-$, uma espécie reativa de oxigénio que pode formar-se pela redução do O_2 em diversas reações enzimáticas, pela ação das radiações ionizantes ou durante a fagocitose por leucócitos, tem sido correlacionado por muitos investigadores com a peroxidação lipídica e a hemólise peroxidativa dos glóbulos vermelhos sanguíneos e de forma mais geral com o envelhecimento celular como descrito por Harman, (175,176) (Figura 1.10). Os enzimas SOD expressam-se em todas as células eucariontes (140,172,177,178). No entanto, Hewitt e Morris (1975) (179) também detetaram essa atividade catalítica em bactérias anaeróbias, tendo igualmente sido purificado, por exemplo, a partir de *E. coli* (180), *Streptococcus mutans* (181), ou da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (182).

Os enzimas SOD podem conter no seu centro catalítico diferentes catiões metálicos, exibindo por esse motivo, cor diferente: os azul esverdeado designados por Cu/ZnSOD, os de cor de vinho designados por MnSOD (172,177,183) e os que exibem coloração amarelada referenciados por FeSOD (184).

O malonaldeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, é um dialdeído de cadeia curta cuja determinação em diferentes tecidos, por reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), é usualmente utilizada para estimar danos oxidativos (185–188). A peroxidação de fosfolipídios de membrana é, em geral, acompanhada por um aumento da concentração de MDA e conseqüente aumento da rigidez e deformação membranar. O excesso de MDA pode ainda despoletar efeitos citotóxicos que envolvem inibição enzimática, degradação de dGMP com danos no DNA (185–187,189).

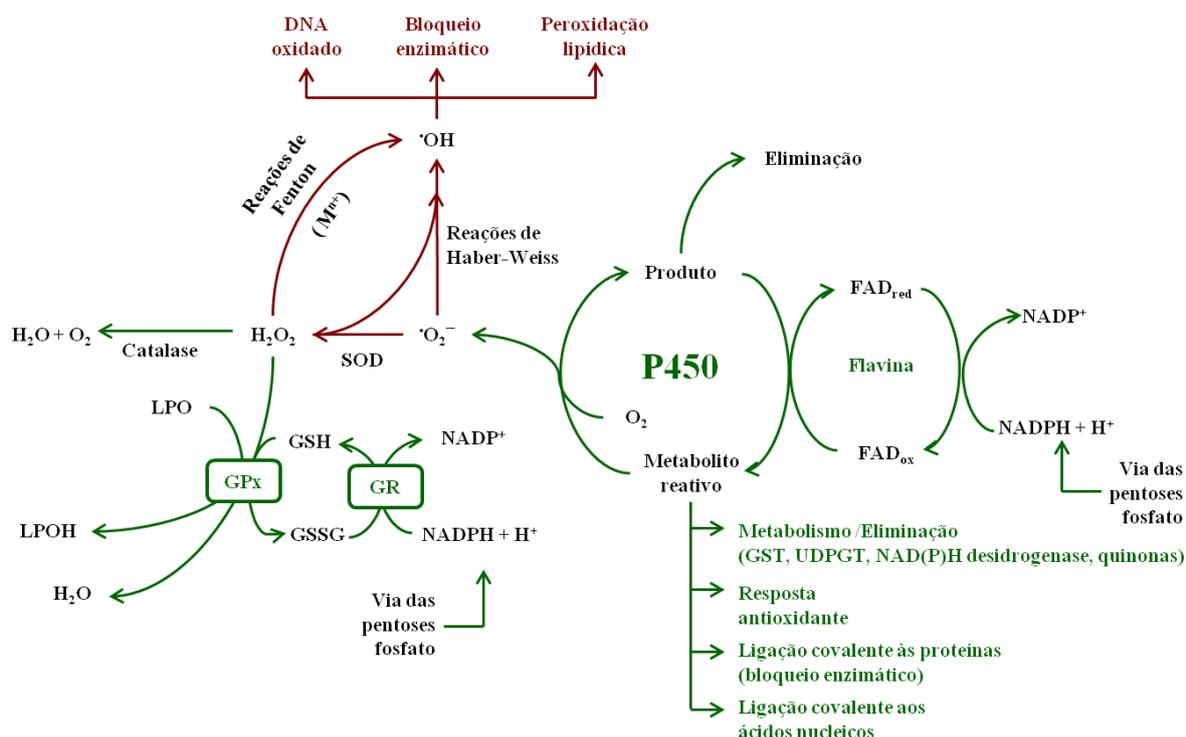


Figura 1.10 - Diagrama representativo de algumas vias de resposta a metabólitos reativos, de geração de ROS e seus alvos celulares, bem como de vias antioxidantes de organismos eucariontes (adaptado de Carvan, 2015) (190).

O *stress* oxidativo em espécies piscícolas surge como consequência do contacto com poluentes, uma vez que estes animais encontram-se constantemente expostos a uma elevada pressão ambiental. Porém, estudos relativos à caracterização dos mecanismos de defesa antioxidativos em espécies piscícolas são escassos. Por outro lado, efeitos deletérios associados a contaminantes ambientais tornam-se, por vezes, difíceis de avaliar, uma vez que muitos deles tendem a manifestar-se após longos períodos de tempo, ou terminam numa aparente resposta adaptativa (34,113,191,192).

Embora a existência de uma relação estreita entre disfunções biológicas e o ambiente seja descrita desde a antiguidade clássica, como pode ser atestado por diferentes textos escritos há mais de 2000 anos (78), preocupações sérias relativas à poluição ambiental que envolvam a sociedade em geral e em particular a comunidade científica corresponde a um fenómeno recente. Rachel Carson (1962), na sua luta contra o uso indiscriminado de produtos fitofarmacêuticos organoclorados, devido à ameaça que constituíam para os organismos vivos, incluindo o Homem, iniciada no seu livro *Silent Spring* (57), pode ser considerada pioneira em estudos ecotoxicológicos (78).

O alerta precoce dos efeitos tóxicos dos poluentes, particularmente em áreas poluídas pode ser previsto utilizando apenas uma abordagem que inclua um ou mais biomarcadores de *stress* oxidativo e/ou de respostas adaptativas (67,78,169,192,193).

Os sistemas de defesa antioxidantes das espécies piscícolas são muito sensíveis a fatores ambientais dependendo muitas vezes do tipo de poluição, níveis de iões metálicos, salinidade e temperatura do local em que os animais se encontram. Facto que torna necessário comparar respostas antioxidativas de indivíduos da mesma espécie que tenham sido capturados em locais poluídos e não-poluídos. Contudo, torna-se evidente que as múltiplas atividades humanas impedem que se encontre com frequência um local de referência para os critérios descritos na frase anterior (140,145,194–196). Por esse motivo, estudos comparativos para a determinação de potenciais sequestradores de ROS entre indivíduos nativos expostos e não expostos a condições de *stress* são escassos (140,147,167,197). No entanto, o aumento do conteúdo celular de ROS aparece algumas vezes associado à ocorrência de danos oxidativos que afetam o bem-estar das espécies piscícolas. O crescente aumento de contaminantes químico-agrícolas, de metais pesados, de resíduos domésticos, bem como a eutrofização e utilização incorreta dos recursos hídricos tem gerado nos últimos anos um aumento da poluição do meio aquático. Os lagos e aquíferos constituem assim os locais mais propensos a receber e acumular contaminantes químicos provenientes da descarga acidental dos esgotos da indústria química, bem como do escoamento de resíduos domésticos e agrícolas (194,198–201).

A realização de estudos sobre a exposição de organismos aquáticos a condições de *stress* mistas, como por exemplo a presença de um herbicida acumulada com a de outro(s) produtos fitofarmacêuticos, ou com outras alterações físico-químicas do seu habitat, tornaram-se prementes, uma vez que os efeitos sinérgicos/antagonistas que lhes podem estar associados, são imprevisíveis ou ininterpretáveis, a partir de análises exclusivamente químicas da composição do ambiente aquático, pois alguns contaminantes acumulam-se em tecidos sem induzir efeitos tóxicos, enquanto outros são conhecidos pela sua elevada toxicidade para níveis baixos de exposição (123,162,202–205). Além disso, tornou-se impraticável analisar individualmente ou em múltiplas combinações todos os produtos químicos que fazem parte de uma mistura de contaminantes ambientais. Assim, a utilização de respostas biológicas por espécies aquáticas tem ganho relevância na avaliação toxicológica de um determinado ecossistema, uma vez que permite a deteção precoce de efeitos globais de contaminantes, fornecendo informações que refletem eventuais interações químicas, mesmo a nível sub-letal (123,194,195,206–209).

Nesse sentido, estudos que envolvam biomarcadores de *stress* oxidativo parecem ser particularmente promissores (140,206,208,210). Muitos contaminantes ambientais são capazes de induzir *stress* oxidativo em animais aquáticos, incluindo espécies piscícolas. Uma resposta corrente na detecção da toxicidade de diversos poluentes prende-se com a detecção de alterações nos níveis de ROS intracelulares e com a detecção de perturbações na eficiência da resposta antioxidante que muitas vezes constituem um prelúdio do aparecimento de alterações em biomoléculas como as que causam danos no DNA, peroxidação lipídica e indução/inibição de atividades enzimáticas vitais à sobrevivência celular. Deste modo encontram-se descritos na literatura diversos estudos que relacionam alterações da resposta antioxidante enzimática e não enzimática, aplicadas à detecção de *stress* ambiental (26,198,206,208,211–213). Além disso, a relevância preditiva da atenuação dos efeitos tóxicos com base nos níveis de lipoperóxidos (LPO) também tem sido revelada em diversos estudos com animais que crescem em meio aquático (198,212,214).

Assim, a atenuação dos efeitos tóxicos de um dado poluente parece depender maioritariamente do equilíbrio oxidante/antioxidante da célula que pode ser perturbado pelo contacto com xenobióticos. Por exemplo, o reforço da taxa de oxigenação pelos poluentes pode potenciar a toxicidade, via *stress* oxidativo, tornando as respostas antioxidantes de espécies piscícolas menos eficazes. Alguns trabalhos revelam ainda que os sistemas antioxidantes enzimáticos das brânquias são menos eficazes do que os que se expressam no tecido hepático, contribuindo assim para aumentar a sua vulnerabilidade às ROS (198,205,212,213,215,216).

A resposta antioxidante detetada em espécies piscícolas parece depender da posição anatómica de cada órgão que determina a distribuição dos xenobióticos e a resposta fisiológica específica de cada órgão. No entanto, todos os órgãos revelam uma resistência semelhante a danos resultantes da peroxidação lipídica, sugerindo que os antioxidantes podem ser biomarcadores mais ágeis do que o índice de LPO para exposição a curto prazo. Para além da ativação de enzimas antioxidantes algumas vezes detetados em brânquias, a sua inibição também detetada por vezes no tecido hepático, podem ser indicadores da presença da poluição e da degradação da saúde ambiental (192,198,202,215).

Experiências com as espécies piscícolas *Mugil cephalus* e *Dicentrarchus labrax*, da região mediterrânica do norte de África, revelaram que os níveis de atividade enzimática CAT e SOD branquiais, de indivíduos capturados em locais poluídos eram significativamente inferiores aos detetados em indivíduos capturados em zonas não poluídas (43). Nascimento, em 2012, revelou que herbicidas como a atrazina também afetavam a secreção de cortisol em

algumas espécies piscícolas, como o *Prochilodus lineatus* (124). Rodrigues em 2015 observou também que diversos poluentes industriais induziam um aumento das atividades enzimáticas G6PD, CAT, SOD e GR hepáticas de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* (219).

Algumas atividades humanas, como a agricultura, a indústria e a extração de recursos naturais têm contribuído para o aumento dos níveis de salinidade dos cursos de água, facto que parece ter sido amplificado pela escassez de água doce em diversas regiões do nosso planeta e que se prevê venha a aumentar, devido ao aquecimento global (26).

A forma como a salinidade interfere na resposta antioxidativa ao contacto com xenobióticos é ainda pouco conhecida, embora se encontrem descritos na literatura alguns estudos relativos a esse problema. Por exemplo, já em 1990, Cynthia e Carl descobriram que uma diminuição da salinidade provocava um aumento na absorção do cádmio por *Palaemonetes spp.* com conseqüente aumento da sua toxicidade (219.1). Brecken-Folse em 1994 observaram ainda que níveis de salinidade elevada potenciavam a toxicidade de diversos produtos fitofarmacêuticos, também em *Palaemonetes spp.* (220), enquanto Tu, em 2012, observou que a salinidade afetava significativamente a resposta à deltametrina por *Penaeus monodon*, induzindo um aumento do conteúdo em tióis totais não proteicos e da atividade enzimática catalase do hepatopâncreas e das brânquias (218). Por outro lado Wang, em 2015, observaram que alterações de salinidade provocavam um decréscimo das atividades enzimáticas SOD e GPx, sem perturbar a atividade CAT do hepatopâncreas do *Litopenaeus vannamei*. (221)

Os vertebrados necessitam de manter a concentração salina intracelular estável. Assim, em água doce, as espécies piscícolas necessitam de contrariar permanentemente a perda de sal e a hidratação, enquanto em ambiente marinho têm de responder à sobrecarga de sal e desidratação (153).

Os sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* oxidativo branquiais e/ou hepáticos, são assim cada vez mais considerados alvos preferenciais de pesquisa, no domínio da absorção, metabolização e excreção de xenobióticos, uma vez que alterações de conteúdos e de atividades enzimáticas podem ser bons biomarcadores de exposição a esses materiais (26,155,222,223).

1.5. Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamina-1,3,5-triazina, ATZ, $C_8H_{14}ClN_5$, CAS 1912-24-9, Figura 1.11) (224,225), um poluente orgânico persistente (POP), constitui o princípio ativo de diversos herbicidas da família das *S*-triazinas que têm sido ubiquamente utilizados no controlo de infestantes de várias culturas agrícolas, apesar de ser considerado agente cancerígeno (185,226) e desregulador endócrino (227).

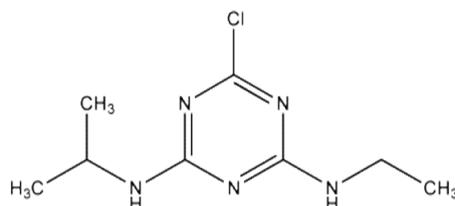


Figura 1.11 - Representação estrutural da atrazina (adaptado de Merck) (225)

A sua estrutura química inclui um anel aromático hexamérico, simétrico, constituído por três átomos de carbono e três átomos de azoto em posições alternadas. Trata-se de uma clorotriazina, uma vez que possui um átomo de cloro (Cl) na posição 1 do anel (225). A solubilidade em água da atrazina é de 30 mg/L a 20 °C (224) e a sua persistência em solos varia entre 41 e 230 dias para ser degradado, e a DL_{50} em ratinho (*Mus musculus*) é de 1750 mg/kg (224). As taxas de degradação normalmente diminuem com o aumento da profundidade, podendo a atrazina ser bastante estável nas águas subterrâneas, pH 5-7 (224,228,229). A ação herbicida principal desta *S*-triazina consiste na inibição da fotossíntese ao nível do fotossistema II, com consequente bloqueio da cadeia de transporte de eletrões do cloroplasto (230). Geralmente, os herbicidas que contêm a atrazina como princípio ativo são utilizados no controlo seletivo de pré e de pós-emergência de infestantes das culturas do milho, espargos, sorgo, cana-de-açúcar e ananás, mas também em silvicultura, no controlo não-seletivo de ervas daninhas de áreas não agrícolas (231–233).

A utilização de atrazina encontra-se regulamentada desde o final do século XX, tendo sido estabelecidos limites máximos para a sua deteção em águas de consumo público na ordem dos 3 µg/L nos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency) e dos 0,1 µg/L na União Europeia (Comissão Europeia) (234).

Devido à sua parca mas longa degradação química e biológica, que envolve hidrólise, adsorção, volatilização, fotólise e degradação biológica, bem como à sua toxicidade para o Homem (235), a sua aplicação foi pela primeira vez proibida na União Europeia em 2004, pela Directiva 2004/248/CE do Conselho de 10 de Março de 2004, em França, Dinamarca, Alemanha, Áustria e Itália (234). Porém, em Portugal, Espanha, Reino Unido e

Irlanda foi concedida uma prerrogativa à referida directiva comunitária, tendo-se autorizado o uso de atrazina até ao final de 2007, data em que deveria ser banida do mercado da União Europeia. Todavia, a atrazina continua a fazer parte da lista de produtos de venda autorizada, sendo comercializada de forma simples ou em mistura com outros herbicidas em Portugal, razão pela qual pode ainda ser detetada em águas superficiais e subterrâneas de regiões agrícolas. Contudo, a utilização intensiva destes herbicidas nos últimos quarenta anos, geraram níveis muito elevados de atrazina e dos seus derivados metabólicos detetados em solos, águas superficiais e subterrâneas de vários países (200,236), como Portugal. Assim, sobre as águas destinadas ao consumo humano, continua-se a avaliar anualmente a sua existência, de acordo com Decreto de Lei no 306/2007, de 27 de Agosto (237), bem como em pesticidas utilizados na agricultura, de acordo com os registos fixados pelos órgãos competentes - Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e das Pescas, e ainda com as Directivas e Normas da Comunidade Europeia (227,230–232).

Porém, a concentração de ATZ determinada no meio ambiente depende de vários fatores que podem perturbar o longo processo de degradação da atrazina, razão pela qual o nível máximo de concentração de ATZ encontrado foi de 0,63 µg/L em Portugal (241). Entre esses fatores pode-se enumerar o tipo de solo, a percentagem de matéria orgânica, o teor de argila, o pH e a estrutura do mesmo, bem como, a própria salinidade nos solos que pode perturbar a degradação da atrazina, uma vez que quanto maior for o teor de salinidade nos solos, menor é a população microbológica presente no meio passível de participar nesse processo (235). Como consequência do processo de volatilização durante a aplicação deste herbicida no solo, podem ser detetadas concentrações de atrazina na água da chuva, podendo alcançar níveis, geralmente, muito baixos (200,231,242), e assim contaminar águas subterrâneas próximas de zonas agrícolas e rios, podendo alcançar prejudicialmente organismos aquáticos. A presença de atrazina acoplada com outros pesticidas, resíduos industriais, produtos fitofarmacêuticos, entre outros xenobióticos, pode agravar o crescimento e o desenvolvimento da lampreia-marinha nas bacias hidrográficas portuguesas (241).

As técnicas tradicionais para o tratamento de solos contaminados com *s*-triazinas envolvem a incineração, a remoção de solo contaminado e a sua transferência para zonas não contaminadas, estratégias economicamente dispendiosas, particularmente no que diz respeito ao tratamento de grandes áreas, uma vez que requerem a remoção e transporte de materiais das zonas contaminadas (243,244). A persistência da atrazina no ambiente, associada à crescente preocupação da opinião pública relacionada com os seus efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos, tem motivado o estudo e o desenvolvimento de estratégias de

biorremediação, cada vez mais eficientes na remoção do herbicida de regiões contaminadas que envolvem o isolamento e identificação de microrganismos não patogénicos com capacidade para a degradar de forma eficiente nos seus produtos: desetilatrizona, hidroatrizona, desisopropilatrizona, diaminocloroatrizona, desetil-hidroxiatrizona e desisopropil-hidroxiatrizona (231,232,241,243,245–248). Em 1998, Prade, Huber e Bieseler procuraram estudar de que forma as GST em plantas conseguem metabolizar herbicidas, como a atrizona (230).

Apesar de a atrizona ser um composto pouco tóxico em espécies piscícolas e em outras formas de vida aquáticas, este consegue alcançar um nível elevado de bioacumulação nesses seres vivos, em particular, no cérebro, vesícula biliar, fígado e intestino de alguns peixes (249,250), perturbando o desenvolvimento e crescimento desses animais (229), afetando a nível molecular os seus sistemas de biotransformação e de *stress* oxidativo (185).

No início dos anos 90, Renaud (1995) sugeriu que o decréscimo populacional de amocetes de *Ichthyomyzon fossor* naturais do rio Yamaska, Québec foi devido à presença de atrizona nessa bacia hidrográfica, após a sua aplicação em campos de milho que provocou a destruição do fitoplâncton, a fonte de alimentação desses indivíduos (47,251).

Em 2012, Smith observou que a presença de atrizona em níveis elevados pode gerar respostas diferentes para odores biologicamente relevantes, muito provavelmente através da inibição da transdução no epitélio olfativo. Facto que pode reduzir a capacidade de *Entosphenus tridentatus* sentir o cheiro de concentrações mínimas de odores característicos associados a importantes fases de desenvolvimento desta espécie, como a migração e a desova. Assim sendo, o crescente decréscimo de populações de lampreia-marinha no território português, justifica a avaliação dos efeitos da atrizona em *P. marinus*, pois este herbicida pode perturbar o número de efetivos populacionais destes animais no seu habitat (252).

Um estudo de Xing (2014) sugere que a exposição de *Cyprinus carpio* a ATZ pode causar alterações marcantes no sistema citocromo P450 desses animais. Além disso, o referido trabalho mostra ainda que a ATZ e os seus derivados metabólicos acumulam-se acentuadamente no fígado de *Cyprinus carpio* (253). Outros estudos revelaram também que a exposição à atrizona provocou um aumento do conteúdo celular de ROS de brânquias de *Lepomis macrochirus* (254). Esses e outros resultados experimentais revelam que os sistemas CYP e de resposta ao *stress* oxidativo podem assim ser utilizados como biomarcadores de exposição de espécies piscícolas à ATZ, podendo por isso ser utilizados como ferramentas úteis na caracterização dos mecanismos de toxicidade da S-triazina em outros tecidos animais do meio aquático (141,152,214,255,256).

1.6. Objetivos

Falhas na estabilização do ambiente redutor intracelular podem induzir peroxidação lipídica em sistemas membranares dos tecidos animais expostos a alterações ambientais, como o hepático ou branquial, com perda da sua viabilidade funcional, pelo que os sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* de juvenis de lampreia-marinha constituem um campo aliciante de investigação. A deteção de alterações metabólicas nos sistemas de biotransformação e/ou de resposta ao *stress* em diferentes fases do ciclo de vida da lampreia-marinha pode assim constituir um bom indicador de exposição a algumas classes de produtos fitofarmacêuticos e/ou de ocorrência de falência celular.

Nas últimas duas décadas foi detetado um decréscimo dos efetivos populacionais de lampreia-marinha em Portugal (13,36,257), pelo que sinais precoces de perigo para a vida desses animais permitirão, por exemplo, avaliar o impacte de xenobióticos, em particular da atrazina, no início da migração trófica de juvenis e consequente sucesso do recrutamento de populações de lampreia-marinha, impossível de avaliar por contagem efetiva dos indivíduos que completam a metamorfose e por não haver garantia desses animais terem sucesso na adaptação ao ambiente salino. Atualmente, as principais medidas de conservação baseiam-se apenas em aumentar a população reprodutora de *P. marinus*, aumentar a área ocupacional atual, promover a continuidade das rotas migratórias, e recuperar/assegurar os habitats de alimentação, reprodução e abrigo. A deteção de eventuais perturbações no sucesso do recrutamento de lampreia-marinha de bacias hidrográficas portuguesas relacionadas com alterações do seu habitat permitirá que sejam tomadas medidas adicionais de conservação para reverter esse cenário, uma vez que a lampreia-marinha é considerada uma espécie vulnerável (13,258) com elevado valor comercial na maior parte dos rios portugueses.

Este estudo teve como principal objetivo caracterizar sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* de *Petromyzon marinus* L, expostos a gradiente de salinidade e/ou à atrazina, tendo em vista avaliar a sua influência no recrutamento de juvenis de bacias hidrográficas portuguesas, no início da fase de migração trófica.

Nesse contexto serão testadas as hipóteses:

- a) H_0 : não existem diferenças significativas entre *P. marinus* provenientes das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego, em termos de sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* condicionadas pela sua permanência no meio dulçaquícola;
- b) H_0 : a exposição em cativeiro ao ambiente salino não altera os sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* de juvenis de *P. marinus* provenientes de diferentes bacias portuguesas;
- c) H_0 : a exposição em cativeiro a xenobióticos em ambiente dulçaquícola não altera os sistemas de biotransformação e resposta ao *stress* de juvenis de *P. marinus* de forma crítica para a migração trófica.
- d) H_0 : a exposição em cativeiro a xenobióticos durante a aclimação ao sal não altera os sistemas de biotransformação e resposta ao *stress* de juvenis de *P. marinus* de forma crítica para a migração trófica.

Capítulo 2

Metodologia

2.1. Estratégia

A concretização dos objetivos traçados para este trabalho obedeceu ao plano seguinte:

Local de realização:

- Laboratório de Bioquímica Analítica, Departamento de Química; Laboratórios do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora

- Sala de Experimentação Animal, Fluviário de Mora, Parque Ecológico do Gameiro, Mora

Apoio financeiro:

- Bolsa individual de doutoramento 2012 SFRH/BD/86820/2012 financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)

- Projeto PTDC/BIA-BEC/103258/2008 “Avaliação do sucesso do recrutamento das principais populações portuguesas de *Petromyzon marinus* por biotransformação, marcadores de *stress* e transporte iónico em juvenis na fase de migração trófica (RECRUIT)” financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)

- Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), no âmbito dos Projetos Estratégicos PEstC/AGR/UI0115/2011, PEst-OE/AGR/UI0115/2014

Modelo biológico:

Lampreia-marinha, *Petromyzon marinus*, L.

Juvenis capturados nas bacias hidrográficas portuguesas do Minho, Lima, Vouga e Mondego

Fatores de *stress* em estudo:

- Salinidade, e/ou

- Atrazina, 1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina

Ensaios:

Ensaio I caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego

Ensaio II caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga

Ensaio III caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola

Ensaio IV caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino

Frações celulares: Mitocondrial, citosólica e microsomal de fígado e brânquias.

Parâmetros analisados:

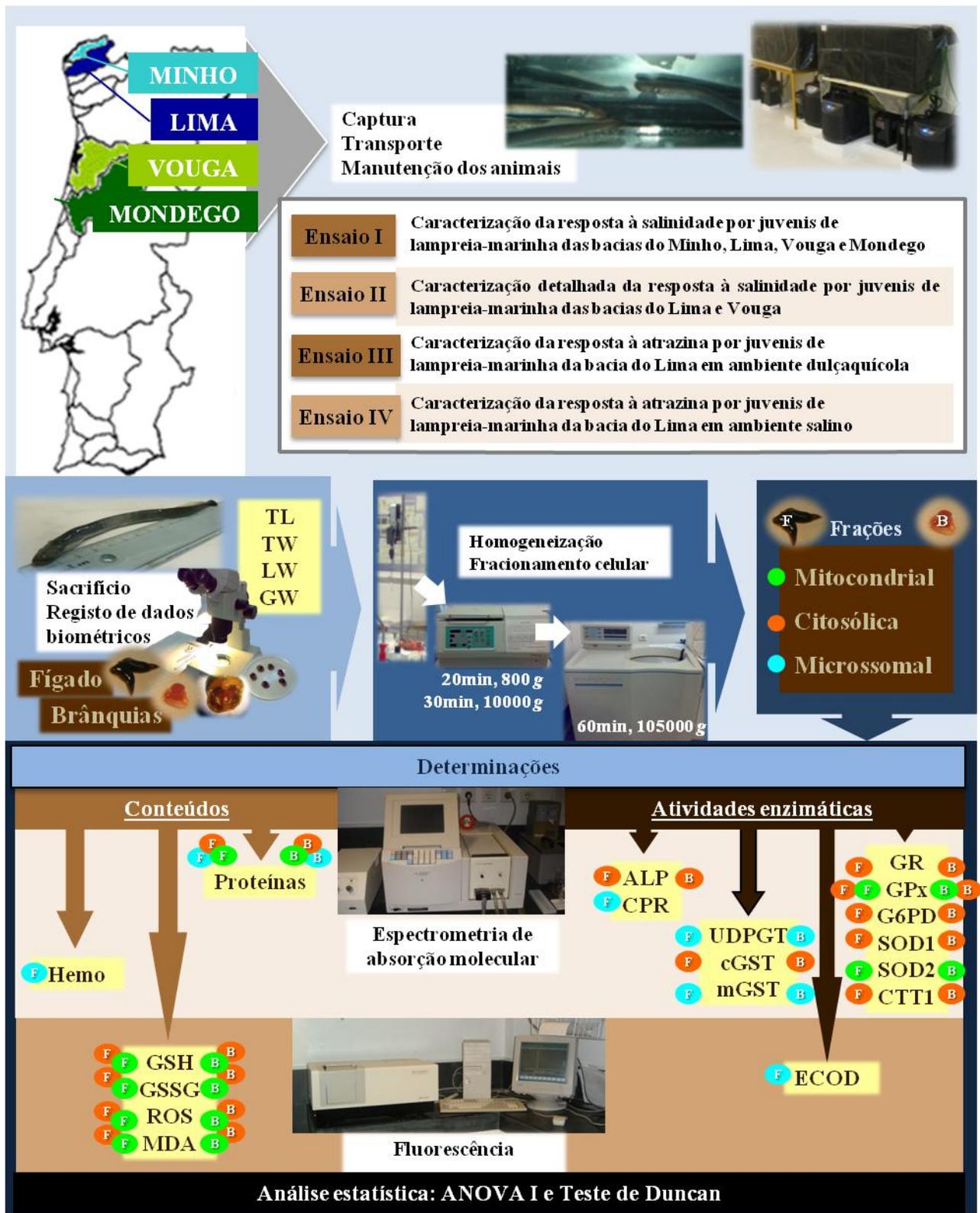
- Dados biométricos: comprimento e peso dos animais, peso húmido das brânquias e fígado
- Estádio de desenvolvimento
- Conteúdo em proteínas
- Marcador não enzimático de biotransformação: hemo
- Marcadores enzimáticos de biotransformação: fosfatase alcalina, NADPH (P450) redutase, 7-etoxicumarina *O*-desetilase, UDP-glicuronosiltransferase, glutationo *S*-transferase microsomal, glutationo *S*-transferase citosólica
- Marcadores não enzimáticos de *stress*: glutationo, dissulfureto do glutationo, espécies reativas de oxigénio
- Marcadores enzimáticos de *stress*: glutationo redutase, glutationo peroxidase, glucose-6-fosfato-desidrogenase, superóxido dismutase, catalase
- Marcadores de danos celulares: malonaldeído

Técnicas utilizadas: pesca elétrica, transporte e manutenção dos animais, dissecação e recolha de órgãos, gravimetria, potenciometria, desintegração celular por homogeneizador de tipo Potter, fracionamento celular, por centrifugação e ultracentrifugação diferencial, espectrometria de absorção molecular, fluorimetria de feixe simples e ferramentas informáticas como folha de cálculo e *software* para análise estatística.

Análise estatística dos resultados: para a análise estatística utilizou-se o programa SPSS, versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para *Windows*, disponibilizado pela Universidade de Évora. Este estudo estatístico foi realizado pela aplicação da análise de variância simples, ANOVA I e teste de significância de Duncan para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$).

Desenvolvimento do trabalho: o desenvolvimento do trabalho decorreu como está representado no organigrama apresentado no sub-capítulo 2.2, seguindo-se procedimento experimental descrito no sub-capítulo 2.3 e a análise estatística dos resultados como descrita no sub-capítulo 2.3.7.

2.2. Organigrama do trabalho



2.3. Procedimento experimental

2.3.1. Delineamento dos ensaios

Os ensaios foram delineados de forma a permitir, de acordo com os objetivos, avaliar sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* detetáveis no fígado e brânquias de *P. marinus* L., em particular a sua influência no recrutamento de juvenis das bacias hidrográficas portuguesas Minho, Lima, Vouga e Mondego no início da sua fase de migração trófica. Assim, com o intuito de selecionar duas bacias hidrográficas portuguesas com distintos indicadores de carga poluente, para posterior caracterização detalhada da aclimação ao meio salino, de juvenis de *P. marinus*, e a sua resposta a xenobiótico em meio dulçaquícola e salino, foram capturados juvenis de lampreia-marinha, no início da fase de migração trófica, nas bacias hidrográficas portuguesas do Minho, Lima, Vouga e Mondego e agrupados em quatro ensaios (Figura 2.1).

O Ensaio I foi estabelecido de forma a caracterizar a resposta à salinidade de juvenis de lampreia-marinha das bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego. Este ensaio era constituído por 3 grupos de tratamentos distintos, com 5 repetições por grupo e 8 animais por repetição:

- Grupo 1: designado de “controlo à chegada”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 7 dias;
- Grupo 2: designado de “controlo do ensaio”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 28 dias;
- Grupo 3: designado de “exposto ao sal”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram submetidos, durante 28 dias, a uma escala gradual e crescente de salinidade, de 0 a 35, de forma que ao 8º, 15º e 22º dia a salinidade nos aquários fosse de 10, 25 e 35, respetivamente.

O Ensaio II foi estabelecido de forma a caracterizar detalhadamente a resposta à salinidade de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga. Este ensaio era constituído por 7 grupos de tratamentos distintos, com 5 repetições por grupo e 8 animais por repetição:

- Grupo 1: designado de “controlo à chegada”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 7 dias;
- Grupo 2: designado de “controlo do ensaio salinidade 10”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos a salinidade 0, durante 14 dias;
- Grupo 3: designado de “exposto à salinidade 10”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram submetidos, durante 14 dias, a uma escala gradual e crescente de salinidade, de 0 a 10, de forma que ao 8º dia a salinidade nos aquários fosse de 10;
- Grupo 4: designado de “controlo do ensaio salinidade 25”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos a salinidade 0, durante 21 dias;
- Grupo 5: designado de “exposto à salinidade 25”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram submetidos, durante 21 dias, a uma escala gradual e crescente de salinidade, de 0 a 25, de forma que ao 8º e 15º dia a salinidade nos aquários fosse de 10 e 25, respetivamente;
- Grupo 6: designado de “controlo do ensaio salinidade 35”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos a salinidade 0, durante 28 dias;
- Grupo 7: designado de “exposto à salinidade 35”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram submetidos, durante 28 dias, a uma escala gradual e crescente de salinidade, de 0 a 35, de forma que ao 8º, 15º e 22º dia a salinidade nos aquários fosse de 10, 25 e 35, respetivamente.

O Ensaio III foi estabelecido de forma a caracterizar a resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola. Este ensaio era constituído por 6 grupos de tratamentos distintos, com 3 repetições por grupo e 8 animais por repetição:

- Grupo 1: designado de “controlo à chegada”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 7 dias;
- Grupo 2: designado de “controlo do ensaio”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 28 dias;
- Grupo 3: designado de “exposto à atrazina 1 µg/L”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 28 dias na presença de atrazina (1 µg/L);

Grupo 4: designado de “exposto à atrazina 10 µg/L”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 28 dias na presença de atrazina (10 µg/L);

Grupo 5: designado de “exposto à atrazina 50 µg/L”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 28 dias na presença de atrazina (50 µg/L);

Grupo 6: designado de “exposto à atrazina 100 µg/L”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 28 dias na presença de atrazina (100 µg/L).

O Ensaio IV foi estabelecido de forma a caracterizar a resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino. Este ensaio era constituído por 4 grupos de tratamentos distintos, com 5 repetições por grupo e 8 animais por repetição:

Grupo 1: designado de “controlo à chegada”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram mantidos em água doce durante 7 dias;

Grupo 2: designado de “controlo do ensaio”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram submetidos, durante 28 dias, a uma escala gradual e crescente de salinidade, de 0 a 35, de forma que ao 8º, 15º e 22º dia a salinidade nos aquários fosse de 10, 25 e 35, respetivamente;

Grupo 3: designado de “exposto à atrazina 50 µg/L em meio salino”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram submetidos, durante 28 dias, a uma escala gradual e crescente de salinidade, de 0 a 35, de forma que ao 8º, 15º e 22º dia a salinidade nos aquários fosse de 10, 25 e 35, sempre na presença de atrazina (50 µg/L);

Grupo 4: designado de “exposto à atrazina 100 µg/L em meio salino”, onde os juvenis de lampreia-marinha foram submetidos, durante 28 dias, a uma escala gradual e crescente de salinidade, de 0 a 35, de forma que ao 8º, 15º e 22º dia a salinidade nos aquários fosse de 10, 25 e 35, sempre na presença de atrazina (100 µg/L).

Ensaio	I			II							III						IV			
Bacias	Minho			Lima							Lima						Lima			
	Lima																			
	Vouga			Vouga																
	Mondego																			
Grupo	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
Captura (dias)	3			5							3						3			
Aclimação (dias)	3			5							3						3			
Experiência (dias)	7	28	7	7	14	7	21	7	28	7	7	28	28·	28·	28...	28....	7	7	7...	7....
			7			7			7									7	7...	7....
			7						7									7	7...	7....
			7						7									7	7...	7....
Nº repetições	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	3	3	3	3	5	5	5	5
Nº animais/repetição	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Nº fígados/repetição (em pool)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Nº brânquias/repetição (em pool)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Legenda:

	Salinidade 0		Salinidade 0 ATZ 1 µg/L		Salinidade 10 ATZ 50 µg/L
	Salinidade 10		Salinidade 0 ATZ 10 µg/L		Salinidade 10 ATZ 100 µg/L
	Salinidade 25		Salinidade 0 ATZ 50 µg/L		Salinidade 25 ATZ 50 µg/L
	Salinidade 35		Salinidade 0 ATZ 100 µg/L		Salinidade 25 ATZ 100 µg/L
					Salinidade 35 ATZ 50 µg/L
					Salinidade 35 ATZ 100 µg/L

Figura 2.1 - Diagrama representativo do delineamento experimental dos ensaios estabelecidos para avaliar os sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* de *P. marinus* L., em particular a sua influência no recrutamento de juvenis das bacias hidrográficas portuguesas Minho, Lima, Vouga e Mondego no início da sua fase de migração trófica.

2.3.2. Locais de captura e manutenção dos animais

Os espécimes de *P. marinus* utilizados neste estudo foram capturados no estágio de juvenis em final da metamorfose (fase 6 -7) denominada por *transformers* ou macroftalmias, a qual sucede a fase de amocetes (Figura 2.2), estando os indivíduos em condições de iniciar a sua migração trófica em direção ao oceano com salinidade 35 (259).

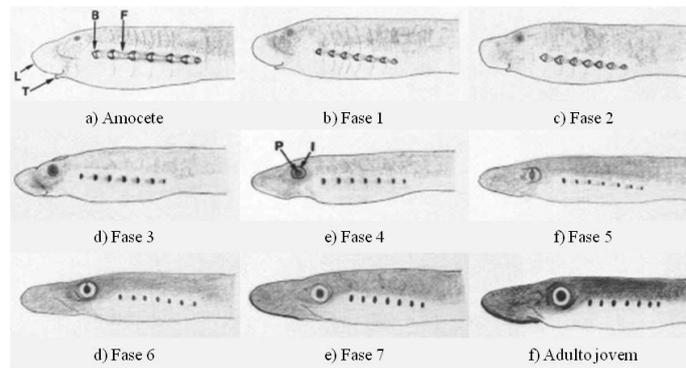


Figura 2.2 - Visão lateral da região anterior das fases larval (amocete), metamórfica (1 a 7) e adulto jovem de *Petromyzon marinus*, L. correspondendo as letras a branquioporo (B), sulco (F), iris (I), lábio lateral do orifício bucal (L), pupila (P), lábio transversal do orifício bucal (T) (adaptado Younson, 1979) (259).

A amostragem de juvenis de lampreia-marinha ocorreu em quatro bacias hidrográficas portuguesas Minho, Lima, Vouga e Mondego, nos pontos de captura já anteriormente identificados por Almeida (15), pelas suas características físicas e ambientais, como associados a ninhos de amocetes onde é iniciada a migração trófica da lampreia-marinha (Figura 2.3).



Figura 2.3 - Mapa de Portugal com localização das bacias hidrográficas: Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro) (adaptado de Santos, 2004) (212,260).

Os juvenis que constituíram o Ensaio I oriundos das bacias do Lima, Vouga e Mondego foram capturados entre outubro e novembro de 2010, e os restantes da bacia do Minho no final de dezembro de 2011. Para o Ensaio II e III os juvenis das bacias do Lima e Vouga foram capturados entre o final de setembro e o início de dezembro de 2011. Os juvenis que integraram o ensaio IV foram capturados na bacia do rio Lima em outubro de 2012 (Quadro 2.1).

Quadro 2.1 - Cronologia do período de captura dos juvenis de lampreia-marinha das bacias hidrográficas portuguesas Minho, Lima, Vouga e Mondego.

Ano	Mês	Bacia	Ensaio
2010	Outubro	Lima	I
		Vouga	
	Novembro	Mondego	
2011	Setembro	Vouga	II
	Outubro		
	Novembro	Lima	I
	Dezembro	Minho	
		Lima	
	2012	Outubro	Lima
Lima			IV

A data de captura dos juvenis de lampreia-marinha no início da migração trófica foi condicionada pelas condições meteorológicas, particularmente pela pluviosidade nas bacias hidrográficas da amostragem, fator que pode acelerar ou retardar a partida dos animais que se encontram nos leitos dos rios e pretendem alcançar o meio marinho.

Os juvenis de lampreia-marinha apenas são capazes de abandonar o ninho e iniciar a sua migração quando o caudal dos ribeiros onde se encontram o permite (7,13,23). Geralmente, esse abandono do ninho ocorre após as primeiras chuvas de outono, fator que apresenta elevada variabilidade anual nas bacias hidrográficas portuguesas (13,28,261). Assim, procurou-se capturar os juvenis de lampreia-marinha no período que coincidia com a iniciação da migração trófica do maior número de efetivos.

Os mapas da Figura 2.4 permitem conhecer a precipitação total observada nos meses em que ocorreu a captura dos animais para o ensaio (262). Na referida figura, outubro de 2010 evidencia-se muito chuvoso em Portugal continental, principalmente no início do mês na região Norte. Novembro do mesmo ano foi um mês normal a seco em quase todo o território nacional, com exceção das regiões do Litoral Norte (Minho e Douro Litoral, Beira Litoral) e Lisboa. Ao comparar-se os valores registados de precipitação aquando da captura dos animais com o valor médio correspondente ao período 1971-2000, observou-se um aumento de cerca de 200 % de quantidade de precipitação observada em alguns locais da região Norte e da área metropolitana de Lisboa (Figura 2.5) (262). Os elevados valores de precipitação provocaram um caudal elevado nas quatro bacias hidrográficas em estudo, podendo ter estado na origem de uma convergência da migração de animais nestes meses e com um número de juvenis migratórios quase inexistente nos meses seguintes. Razão pela qual, possivelmente este período terá sido o único para a captura de animais nas bacias do Lima, Vouga e Mondego.

Desse modo, possivelmente terá impedido a captura de juvenis na bacia do Minho devido ao elevado caudal com migração concentrada num curto tempo.

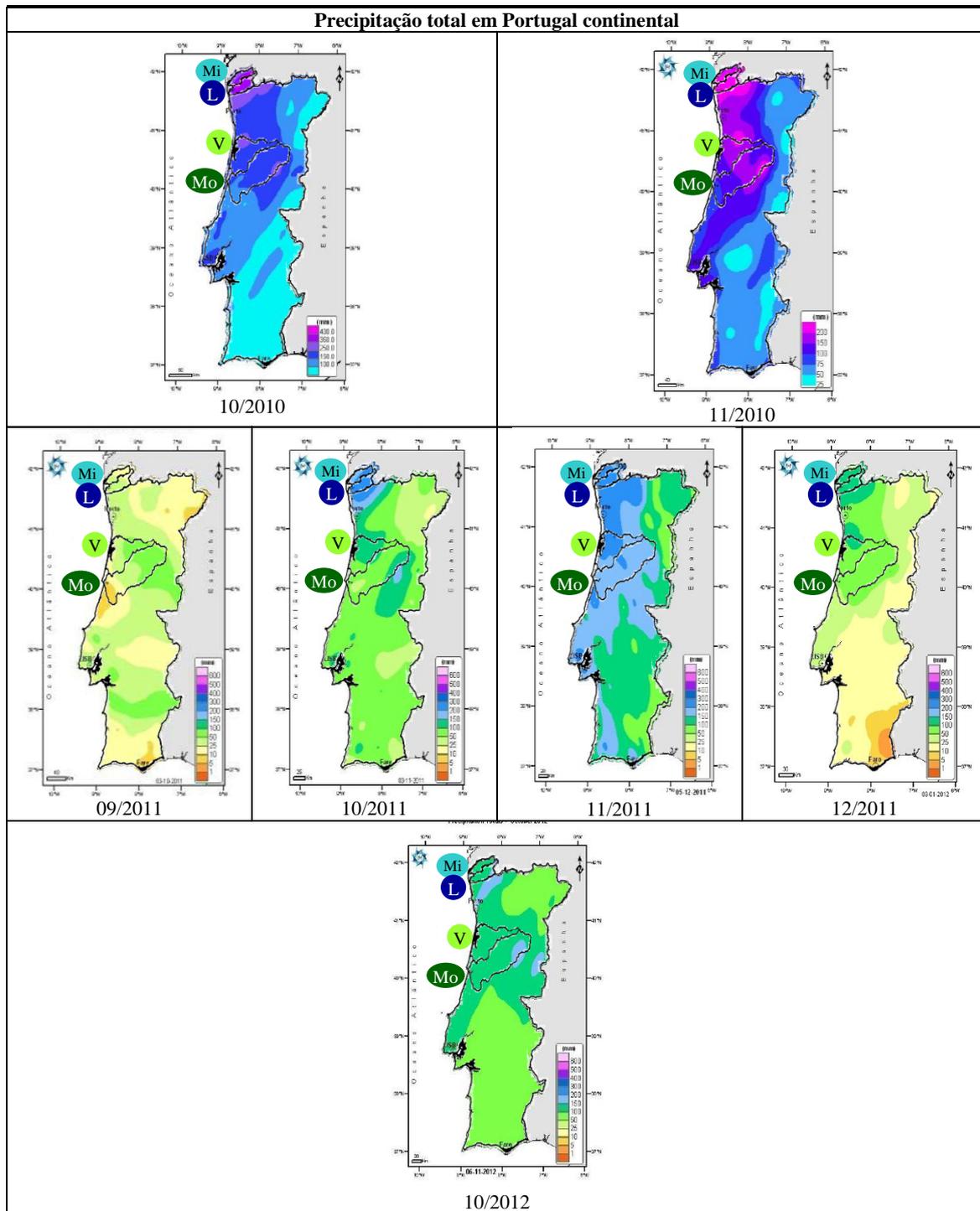


Figura 2.4 - Precipitação total nos meses de captura de juvenis de lampreia-marinha nas bacias hidrográficas do Minho (Mi), Lima (L), Vouga (V), Mondego (Mo) em outubro e novembro de 2010, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2011 e outubro de 2012 em Portugal continental (adaptado do Boletim Climatológico Mensal obtido pelo Instituto de Meteorologia, I.P.) (262).

No ano de 2011, setembro foi um mês seco a muito seco em toda a região Norte e normal a chuvoso na região Centro. A quantidade de precipitação ocorrida em setembro de 2011 foi inferior ao normal na região Norte e em grande parte da região Centro (262). O mês de outubro de 2011 foi normal a chuvoso no território continental, sendo seco em alguns locais do litoral Centro (Figura 2.4). Ao compararmos com o valor médio 1971-2000 (Figura 2.5) a quantidade de precipitação nestes meses foi inferior ao normal em grande parte do território. Os valores de precipitação elevados ocorridos a partir do dia 23 foram suficientes para estas regiões ultrapassarem os valores normais para este mês. Novembro de 2011 foi um mês chuvoso em todo o território de Portugal continental, pois a quantidade de precipitação registada, em relação ao valor médio no período 1971-2000 foi superior ao normal em quase todo o território nacional, mas o mês de dezembro de 2011 já foi seco a muito seco (262). A particular distribuição pluviométrica descrita pode ter estado na origem de uma dilatação do período de migração de juvenis. Por um lado, dificultou a captura devido ao baixo número de indivíduos em migração, mas por outro permitiu a ampliação da época de captura por quatro meses nas bacias dos rios Minho, Lima e Vouga.

Em 2012, outubro mostrou uma diminuição significativa da situação de seca ao poder ser classificada como um mês normal a chuvoso em todo o território. De um modo geral, o valor médio da quantidade de precipitação foi próximo ou superior ao valor médio no período 1971-2000, exceto no Minho e na região de Aveiro onde foram inferiores (Figuras 2.4 e 2.5). Apesar da baixa pluviometria comprometedora do número de animais migratórios foi possível realizar uma última captura, neste caso na bacia do rio Lima (262).

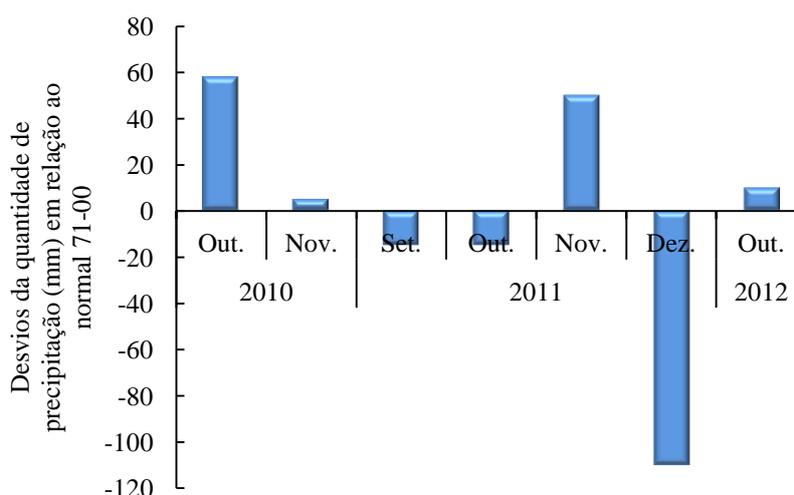


Figura 2.5 - Desvios da quantidade de precipitação total em Portugal Continental em relação ao normal 71-00 nos meses de outubro e novembro de 2010, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2011 e outubro de 2012 (adaptado do Boletim Climatológico Mensal obtido pelo Instituto de Meteorologia, I.P.) (262).

Ao longo do período de captura a amostragem foi realizada no sentido de jusante para montante, em zonas pouco profundas, tendo os juvenis de lampreia-marinha sido capturados a pé com um equipamento de pesca elétrica (Hans Grassl EL 62 gerador DC, 600 V) e uma única passagem de acordo com o protocolo de amostragem definido pelo Comité Européen de Normalisation (263).

Os animais foram sempre transportados vivos para o Laboratório de Experimentação Animal Aquático do Fluvial de Mora em tanques de água doce com 400 L de capacidade equipados com um sistema de suporte de vida adequado, incluindo a aeração, sistema de manutenção da qualidade da água e controlo de temperatura.

Durante o período de aclimação, no mínimo 8 dias antes do início do ensaio, e durante o ensaio (Ensaio I a IV) os animais permaneceram em tanques de 200 L contendo água de qualidade controlada, fornecida pelo Fluvial de Mora e a qual permaneceu sob monitorização nos tanques ao nível da qualidade (temperatura, pH, amónia, nitritos, nitratos, salinidade, concentração de ATZ). Os animais estiveram em escuridão constante, para evitar o *stress* relacionado com o comportamento de fototaxia negativo, à temperatura constante a 14°C, pH 8,2 e com aeração (O₂ 97 a 100 %), sem qualquer fornecimento de alimentação. Nos ensaios I, II e IV a salinidade foi controlada pela adição de sal e monitorizada diariamente (Figura 2.1 e 2.6).

O estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações presentes no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da União Europeia - em Portugal representado pelo Decreto-Lei n° 129/92, Portaria n° 1005/92 transposto para o Decreto-Lei n° 113/2013 (264). Este trabalho foi realizado sob uma licença institucional (Fluvial de Mora - aquário de água doce Mora) para a experimentação animal e de uma licença pessoal de M Candeias, I Alves-Pereira, MJ Lança, BR Quintella, PR Almeida e R Ferreira, emitido pela Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), a Autoridade Nacional Portuguesa de Saúde Animal.



Figura 2.6 - Aquários com temperatura controlada e protegidos da luz utilizados para permanência dos juvenis de lampreia-marinha durante os ensaios (fotografias do autor).

2.3.3. Caracterização morfométrica

A morfometria é usualmente definida como o estudo da forma e do tamanho de um indivíduo e como estas variáveis se relacionam entre si. Ao longo do tempo foram estabelecidas proporções entre as diversas partes do corpo e utilizadas nas descrições taxonómicas, nomeadamente na identificação de peixes, bem como para estabelecer o seu estágio de desenvolvimento e condição física (15,265). Assim, os animais provenientes das bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego foram anestesiados pelo frio de forma a permitir o registo de alguns parâmetros morfométricos, como o comprimento total do animal (TL; 0,00 cm) entre a extremidade bucal e a barbatana caudal, o peso total (TW; 0,00 g), bem como o peso húmido do fígado (LW; 0,0000 g) e das brânquias (GW; 0,0000 g) de cada indivíduo (sub-capítulo 2.3.4.1), possibilitando o cálculo dos índices hepato-somático (HSI, %) e branquio-somático (GLSI, %), e ainda o fator de condição de Fulton (K) (266).

O fígado, um importante órgão de desintoxicação, é bastante sensível às condições fisiológicas a que pode ser condicionado, por exemplo pela exposição a contaminantes, uma vez que estas podem promover o aumento do tamanho do órgão (hipertrofia) ou o aumento do número de hepatócitos (hiperplasia). O índice hepato-somático que expressa em percentagem o peso do fígado em relação ao peso total do corpo é utilizado por vários investigadores para comparar o tamanho relativo do fígado de espécies piscícolas provenientes de locais contaminados com outros capturados em locais de referência (210,255,266). Assim, a equação utilizada neste trabalho para obter o valor de HSI foi:

$$\text{HSI (\%)} = \frac{\text{LW (g)}}{\text{TW (g)}} \times 100$$

As brânquias apresentam uma ampla superfície que estabelece em permanência contacto e trocas com o meio aquático circundante, o que as torna a principal via de absorção, sendo, por esse motivo, suscetíveis a alterações do meio ambiente. Surge então a necessidade de expressar a relação entre o peso das brânquias e o peso total do corpo de juvenis de lampreia-marinha, originando o índice branquio-somático, calculado de acordo com a equação:

$$\text{GLSI (\%)} = \frac{\text{GW (g)}}{\text{TW (g)}} \times 100$$

O fator de condição tipo Fulton (K) é o parâmetro morfométrico que permite avaliar o estágio de desenvolvimento da lampreia-marinha, o qual expressa, na sua forma mais simples, a relação entre o peso total do animal e o seu comprimento elevado ao cubo (15,267–271).

Galileu Galilei (1564-1642) foi quem primeiro descreveu a possível relação existente entre peso e comprimento, pela Lei Cubo Quadrática que defende que tanto a massa como o peso de animais com massas e formas semelhantes variam com o cubo das suas dimensões. Porém, Fulton (1904), ao ter aplicado a lei do cubo num número elevado de espécies piscícolas, concluiu que esta lei não se aplica com a precisão adequada a todos os indivíduos então analisados, uma vez que o peso das espécies que estudou aumentou muito em relação ao comprimento, entrando assim em desacordo com a Lei Cubo Quadrática. Fulton também constatou que o peso para um determinado comprimento difere entre espécies diferentes. Porém, dentro de cada espécie essa proporção variava consoante o lugar onde os animais se encontravam, a época do ano e a fase de desenvolvimento dos mesmos (268).

Fulton descreveu assim, pela primeira vez, uma equação matemática que relaciona a variação exponencial do peso com o comprimento, permitindo inferir sobre as várias condições de crescimento alométrico, da forma, da variação espacial, sazonal e reprodutiva, dos diferentes estádios de desenvolvimento de cada animal, jovens ou adultos. Porém, Fulton não abandonou a Lei Cubo Quadrática, tendo apresentado para o cálculo do peso e comprimento com a base numa relação peso-comprimento fixo. Mais tarde, Duncker (1923) afirmou que a relação de Fulton que era aplicada a classes de animais com menor comprimento, deveria ser aplicada também a todas as outras espécies (15,267–269).

O fator de condição de Fulton depende não só de fatores genéticos e do estado fisiológico dos indivíduos, mas também de fatores físicos e ambientais como a salinidade e a disponibilidade de alimento (272). Pelo que disponibiliza importante informação sobre o estado fisiológico, taxa de crescimento, estado nutricional, potencial reprodutivo e de bem-estar dos espécimes num dado ambiente, a partir do pressuposto de que indivíduos com maior massa num dado comprimento estão em melhor condição (268,271–273).

Assim, foi calculado o fator de condição de Fulton que permite comparar o bem-estar dos animais entre os locais de coleta (270). A fórmula utilizada foi uma extensão do fator de condição de Fulton desenvolvido por Ricker (1975) que não assume obrigatoriamente um crescimento isométrico (270,273):

$$K = \frac{TW (g)}{TL^b (cm)} \times 100$$

onde se observa a relação entre o peso total em g (TW) e comprimento total em cm (TL), correspondendo a letra b ao declive da relação peso-comprimento de amocetes de lampreia-marinha para cada bacia hidrográfica (15).

2.3.4. Fracionamento celular

2.3.4.1. Recolha e determinação do peso húmido dos órgãos

Após anestesia pelo frio e sacrifício dos animais por decapitação procedeu-se à exsanguinação dos animais, à abertura das cavidades torácica e abdominal de forma a possibilitar a recolha das brânquias e do fígado de cada animal, com a ajuda de lupa estereoscópica. Os órgãos foram de imediato colocados em meio de homogeneização, KCl (0,154 M) em tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,4 a 4 °C.

O peso individual dos órgãos, LW e GW, foi registado após a sua lavagem e secagem em papel de filtro Whatman nº1.

2.3.4.2. Preparação dos homogeneizados

Os homogeneizados do tecido hepático e branquial, devido à pequena dimensão destes órgãos em juvenis de lampreia-marinha, foram preparados a partir de *pools* de oito fígados (8#) com aproximadamente 0,2923g \pm 0,0451 ou de três brânquias (3#) com aproximadamente 0,2393g \pm 0,0665. Os órgãos de cada *pool* foram recolhidos em animais da mesma repetição.

As amostras foram transferidas para o copo do homogeneizador, mantido a 4 °C e homogeneizadas com 9,0 mL, no caso do fígado e 6,0 mL, no caso das brânquias, de meio de homogeneização KCl (0,154 M) em tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,4 num homogeneizador tipo Potter, com 10 impulsos a 6000 rpm (133,274,275).

Os homogeneizados foram transferidos para tubos de centrífuga e mantidos a 4 °C (275).

2.3.4.3. Preparação das frações mitocondrial, microsomal e citosólica

As frações subcelulares foram preparadas de acordo com o procedimento geral de Lake (1987) (275). Os homogeneizados, preparados em meio de homogeneização, foram centrifugados a 800 g durante 20 min, a 4 °C. O sedimento obtido foi desprezado e o sobrenadante pós-nuclear foi centrifugado a 10000 g, durante 30 min, a 4 °C. O sedimento obtido de fígado e brânquias foi ressuscitado, respetivamente, em 4 e 2 mL de meio de homogeneização e distribuído por microtubos que se guardaram a -20 °C, constituindo a fração mitocondrial posteriormente utilizada na determinação de atividades enzimáticas.

Os sobrenadantes pós-mitocondriais obtidos foram transferidos para tubos de ultracentrifuga previamente arrefecidos e centrifugados a 105000 g, durante 60 min, a 4 °C. A

fração citosólica sobrenadante foi recolhida para microtubos que se guardaram a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior determinação de conteúdos e atividades enzimáticas. O sedimento microsomal obtido de fígado e brânquias foi ressuspendido respetivamente em 3 e 1,5 mL de meio de homogeneização. Utilizou-se parte da fração microsomal assim obtida para determinar de imediato a concentração de hemo, assim como a atividade enzimática CPR. A porção remanescente foi distribuída por microtubos que foram guardados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação de conteúdos e atividades enzimáticas (275,276).

2.3.5. Doseamentos nas frações subcelulares

2.3.5.1. Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteína nas frações mitocondrial, microsomal e citosólica dos tecidos hepático e branquial foi determinada de acordo com o método descrito por Lowry (1951) (277). O seu princípio fundamenta-se na reação entre o reagente de Folin-Ciocalteu ou ácido fosfomolibdicofosfotúngstico com os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano das proteínas que na presença do catalisador cobre (II) em meio alcalino induz a formação de um complexo de heteromolibdénio de cor azul intensa e com absorção máxima a 720 nm.

A elevada sensibilidade que o método de Lowry apresenta sobrepõe-se aos possíveis interferentes que podem adulterar a leitura por espectrometria de absorção molecular, como aminoácidos e seus derivados existentes na própria amostra, constituintes de soluções tampão, detergentes, drogas, glúcidos, ácidos nucleicos, sais e reagentes sulfídricos. O possível efeito desses interferentes foi minimizado por existirem em proporções muito diluídas (277).

A curva de calibração foi preparada para o intervalo de concentração de proteína 50-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando uma solução mãe de albumina do soro bovino, BSA (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), como padrão. Simultaneamente, alíquotas das frações mitocondrial, citosólica e microsomal foram diluídas com NaOH (0,5 M) para um volume final de 1 mL.

Adicionou-se a 1 mL de solução-padrão ou de amostra diluída, 5 mL de reagente de Lowry, constituído por sulfato de cobre penta-hidratado 0,1 % (p/v) e tartarato de sódio e potássio 0,2 % (p/v) em carbonato de sódio a 2 % (p/v). Após agitação no vortex adicionou-se 0,5 mL de reagente de Folin, diluído $\frac{1}{2}$ com água bidestilada e voltou-se a agitar. Após 30 min de repouso à temperatura ambiente agitou-se novamente no vortex e registou-se a absorvência a 720 nm.

Construída a curva de calibração no intervalo de concentração com os valores obtidos calculou-se por interpolação gráfica a concentração de proteínas das amostras.

2.3.5.2. Determinação da concentração de hemo

A determinação da concentração de hemo na fração microssomal do tecido hepático aplicou-se a metodologia descrita por Omura e Sato (1964) e Luke (1987) que se baseia no espectro de absorção molecular da sua forma reduzida traçada contra um branco com a sua forma oxidada obtida por reação do hemo com o ferricianeto de potássio, $K_3Fe(CN)_6$ em meio alcalino (97,278).

A fração microssomal de tecido hepático (proteínas $\approx 0,747$ mg/mL) foi diluída para metade em 0,500 mL de KCl (0,154 M) distribuindo igual volume por duas células de espectrometria de absorção molecular, às quais se adicionou 0,166 e 0,163 mL de NaOH (0,5 M) às células de leitura e de referência, respetivamente, e 0,166 mL de piridina a ambas as células. Em seguida, adicionou-se uma pequena quantidade de ditionito de sódio à célula de leitura e 0,003 mL de solução de $K_3Fe(CN)_6$ (12,5 mM) à célula de referência.

Após agitação suave por inversão, traçou-se um espectro de absorção molecular entre 530 e 600 nm e registou-se a diferença de absorvência obtida entre 557 e 575 nm, a qual foi utilizada para o cálculo da concentração de hemo, considerando o valor do coeficiente de absorvidade molar do hemo na sua forma reduzida de $34,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (278).

2.3.5.3. Determinação da concentração de glutatióno e dissulfureto de glutatióno

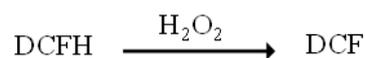
O conteúdo em GSH foi quantificado pelo método fluorimétrico descrito por Hissin em 1976 (279), utilizando *o*-ftalaldeído (OPT) para desenvolver um fluoróforo quantificável. Para tal, preparou-se uma mistura de reação com alíquotas de sobrenadante das frações mitocondrial e citosólica dos órgãos fígado (proteínas $\approx 0,115$ mg/mL e $\approx 0,241$ mg/mL, respetivamente) e brânquias (proteínas $\approx 0,064$ mg/mL e $\approx 0,209$ mg/mL, respetivamente) na diluição adequada, solução padrão (GSH) ou tampão fosfato (10 mM) pH 7,0, no caso do branco, à qual se adicionou tampão fosfato (0,1 M) pH 8,0 com EDTA (0,005 M) e OPT na proporção de 1:30:2. Após agitação a mistura incubou 15 min à temperatura ambiente e realizou-se a leitura de fluorescência a λ_{exc} 350 nm e a λ_{em} 420 nm. A concentração em GSH por peso de fígado (g) ou brânquias (g) foi determinada por interpolação gráfica recorrendo à

curva de calibração previamente construída com padrões de GSH, para o intervalo de concentração (0,5–100 μM).

O conteúdo em GSSG foi quantificado pelo método fluorimétrico descrito por Zieliński em 1999 (166), que se baseia na capacidade do NEM para sequestrar o GSH endógeno. Assim sendo, alíquotas das frações mitocondrial e citosólica dos tecidos hepático (proteínas $\approx 0,191$ mg/mL e $\approx 0,402$ mg/mL, respetivamente) e branquial (proteínas $\approx 0,107$ mg/mL e $\approx 0,349$ mg/mL, respetivamente) na diluição adequada, foram incubadas durante 30 min com NEM (20 μM). De seguida, fez-se reagir essa mistura com OPT comercial e NaOH (0,1 M) na proporção 1:1:18, à temperatura ambiente, pH 12,0, durante 15 min. A potência de fluorescência lida a λ_{exc} 350 nm e a λ_{em} 420 nm foi utilizada para calcular a concentração em GSSG por grama de fígado ou brânquias por interpolação gráfica em curva de calibração previamente construída utilizando padrões de GSSG no intervalo de concentração GSH (0,08-80 μM).

2.3.5.4. Determinação da concentração de espécies reativas de oxigénio

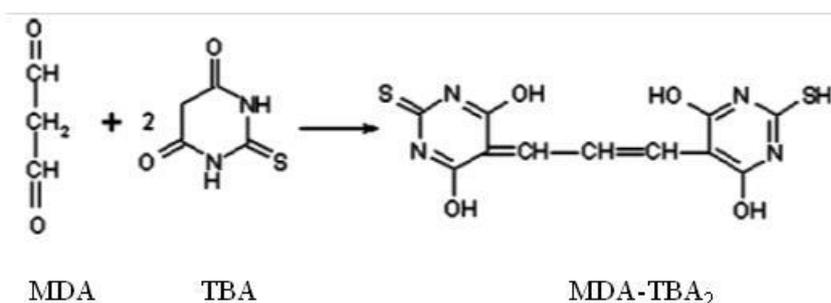
O conteúdo em ROS foi determinado de acordo com o método fluorimétrico proposto por LeBel em 1992 (280) que utiliza o 2',7'-diclorofluorescina (DCFH), o qual na presença de H_2O_2 é rapidamente oxidado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que apresenta fluorescência, facto que permite estimar os níveis de peróxido de hidrogénio presentes na amostra (173):



A solução de diacetato de (DCFH-DA) (1 mM) em tampão fosfato (25 mM) pH 7,4 foi diluída com tampão de Tris-HCl (40 mM) pH 7,4, para obter DCFH na concentração de 25 μM , a qual reagiu com a amostra das frações mitocondrial e citosólica de tecido hepático (proteínas $\approx 0,019$ mg/mL e $\approx 0,040$ mg/mL, respetivamente) e branquial (proteínas $\approx 0,011$ mg/mL e $\approx 0,035$ mg/mL, respetivamente) na proporção 199:1, durante 10 min, a 37 °C, após o que se leu a potência de fluorescência da mistura a λ_{exc} 488nm e a λ_{em} 525nm. Preparou-se ainda uma curva de calibração com soluções padrão de peróxido de hidrogénio no intervalo (0,2-400 mM) que permitiu calcular por interpolação gráfica a quantidade de ROS pelo peso do fígado (g) ou brânquias (g).

2.3.5.5. Determinação da peroxidação lipídica

O conteúdo intracelular em MDA é frequentemente utilizado como marcador de danos oxidativos na célula, uma vez que a formação de aldeídos é o culminar da rutura oxidativa da cadeia carbonada dos resíduos acilo polinsaturados da membrana, resultante da peroxidação lipídica. Assim, a quantificação de MDA foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Ohkawa em 1979 (281), o qual tem como base da quantificação por espetrometria de fluorescência o produto da reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA) (282):

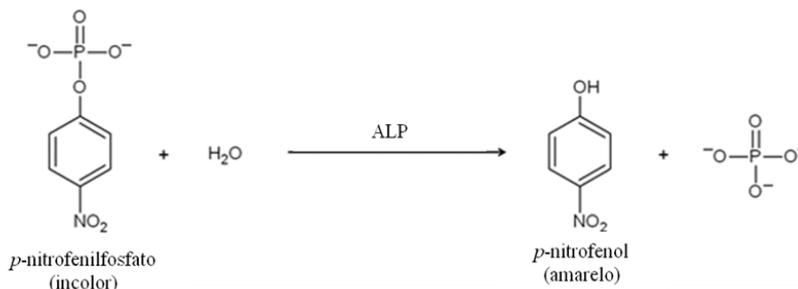


O meio de reação foi preparado com volume adequado das frações mitocondrial e citosólica dos tecidos hepático (proteínas $\approx 0,191$ mg/mL e $\approx 0,402$ mg/mL, respetivamente) e branquial (proteínas $\approx 0,107$ mg/mL e $\approx 0,349$ mg/mL, respetivamente), SDS (8,1 %), TBA (0,4 %) em tampão acetato (10%) pH 3,5 na proporção de 1:2:30. A mistura foi deixada a incubar durante 60 min em banho a 95 °C, com agitação constante, seguindo-se um período de 15 min de arrefecimento em gelo que permitiu parar a reação. Após arrefecimento foi adicionado n-butanol (1:1) seguido de agitação em vortex. Aguardou-se a separação de fases por centrifugação a 1600 g durante 10 min, após 60 min de repouso. Procedeu-se à recolha da fase orgânica que foi utilizada na determinação da potência de fluorescência a $\lambda_{exc} 515$ nm e $\lambda_{em} 553$ nm. O branco foi preparado com a mesma mistura de reação substituindo a amostra por tampão fosfato (10 mM) pH 7,2. A concentração de MDA por grama de fígado ou brânquias foi determinada por interpolação em curva de calibração gerada com soluções padrão de MDA (5 a 100 μ M), obtido por hidrólise de 1,1,3,3-tetrametoxipropano em meio ácido, sujeitas às mesmas condições de ensaio (187).

2.3.6. Determinação de atividades enzimáticas

2.3.6.1. Fosfatase alcalina

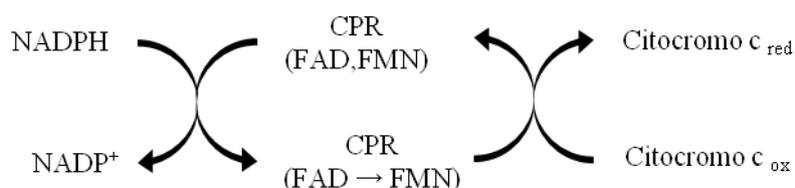
Para a determinação da atividade enzimática ALP acompanhou-se a hidrólise das ligações fosfoéster do substrato sintético *p*-nitrofenilfosfato (pNPP), pela leitura do incremento da absorvência a 405 nm devido à formação de *p*-nitrofenol (pNP), um dos produtos da reação, de acordo com o método proposto por Breaudière (1984) (283), sendo a sua reação característica a seguinte (284):



A mistura de reação foi constituída por alíquotas da amostra citosólica dos tecidos hepático (proteínas $\approx 0,540$ mg/mL) e branquial (proteínas $\approx 0,491$ mg/mL) na diluição adequada, e pNPP (1,2 mM) em tampão Tris-HCl (0,05 M) pH 8,5. O branco utilizado para esta atividade consistiu na mesma mistura de reação à exceção da adição da amostra, sendo o seu volume compensado pela adição de tampão. O valor da atividade ALP foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas ao longo de 300 s, a 37 °C e utilizando o coeficiente de absorvidade molar de $16,03 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o pNPP.

2.3.6.2. NADPH citocromo P450 redutase

A determinação da atividade enzimática da flavoproteína CPR foi realizada de acordo com o método proposto por Peterson (1978) e Lake (1987) (275). Este método utiliza o citocromo c como aceitador artificial de eletrões, uma vez que a sua forma ferrosa possui um máximo de absorção a 550 nm de acordo com a reação de oxidação-redução (101):

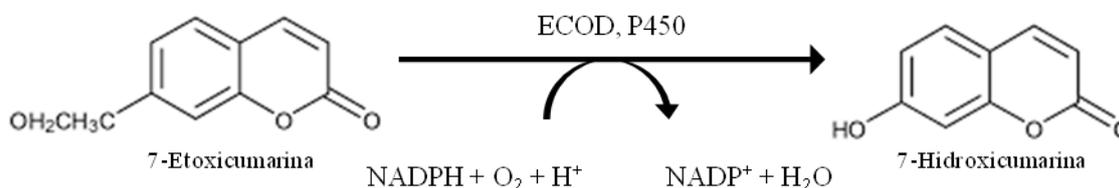


Alíquotas de fração microsomal do tecido hepático (proteínas $\approx 0,045$ mg/mL) foram incubadas num meio composto por citocromo c (0,125 mM), cianeto de potássio (15 mM) e em tampão fosfato (0,1 M) pH 7,6, a 37 °C, durante 3 min. Após esse período de tempo, adicionou-se NADPH (10 mM) para iniciar a reação e registou-se a variação de absorvência ao longo do tempo durante 180 s, a 550 nm, lida contra um branco de composição idêntica à das células de leitura mas onde a solução de NADPH foi substituída por igual volume de solução tampão fosfato (0,1 M) pH7,6.

Após determinação dos coeficientes angulares das retas obtidas, procedeu-se ao cálculo da atividade enzimática, utilizando como valor do coeficiente de absorvidade molar $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a forma ferrosa do citocromo c (275,285).

2.3.6.3. 7-etoxicumarina-O-desetilase

A determinação da atividade enzimática ECOD foi realizada de acordo com o método modificado por Lake (1987) (275), o qual permite a determinação rápida desta atividade catalítica, em simultâneo de um grande número de amostras através da determinação de ponto final da intensidade da fluorescência, emitida pela 7-hidroxycumarina, produto da O-desetilação da 7-etoxicumarina (286):



Incubaram-se alíquotas de fração microsomal hepática (proteínas $\approx 0,299$ mg/mL) num meio de reação contendo 7-etoxicumarina (0,5 mM), NADP⁺ (0,75 mM), ácido D,L-isocítrico (7,5 mM), sulfato de magnésio hepta-hidratado (5 mM) e isocitrato desidrogenase (1 U), diluídos em tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,8, para um volume final de 2 mL.

Após a pré-incubação da mistura de reação em banho a 37 °C, com agitação constante de 100 ciclos min⁻¹, durante 5 min, iniciou-se a reação pela adição do substrato, 7-etoxicumarina, e deixou-se a reação decorrer durante 10 min nas mesmas condições de agitação e temperatura. Após esse período de tempo os tubos de ensaio foram colocados em gelo e adicionado a cada tubo 1,0 mL de sulfato de zinco (5 %, p/v) e 2,0 mL de solução

saturada de hidróxido de bário, o que permitiu parar a reação. Após agitação dos tubos no vortex e centrifugação a 2000 g, durante 15 min, à temperatura de 4 °C, recolheu-se 1,0 mL de sobrenadante, ao qual foi adicionado 2,0 mL de tampão NaOH-glicina (0,5 M) pH 10,5.

Procedeu-se a uma nova agitação dos tubos no vortex e registou-se a intensidade de fluorescência entre λ_{exc} 380nm e λ_{em} 452nm, com a abertura de fenda de 1 e 3 mm, respetivamente.

Ao longo deste processo, em simultâneo para cada amostra preparam-se ensaios em branco e ensaios com padrão de referência. Nos ensaios em branco a solução de 7-etoxicumarina só foi adicionada ao meio reacional após 10 min de incubação. Nos ensaios com o padrão de referência manteve-se a composição e ordem de adição dos ensaios em branco, mas adicionou-se 7-hidroxicumarina (0,1 mM) após a adição do substrato.

Leram-se e registaram-se os respetivos valores de intensidade de fluorescência aos mesmos comprimentos de onda das amostras.

A atividade enzimática foi determinada por interpolação do valor de fluorescência registado para as amostras com o valor de fluorescência registado para o respetivo padrão.

2.3.6.4. Uridina-difosfato glicuronosil transferase

O metabolismo de uma variedade de xenobióticos e moléculas endógenas contendo grupos hidroxilo, carboxilo, amina ou sulfidriolo ocorre preferencialmente através da glicuronidação, mediada pelo enzima UDP-glicuronosil transferase. Esta família de enzimas membranares, localizada no retículo endoplasmático, catalisa a ligação do ácido UDP-glicurónico (UDPGA) para uma multiplicidade de xenobióticos e moléculas endógenas, com libertação de UDP. Os conjugados de ácido glicurónico são geralmente mais polares do que os seus compostos originais respetivos e assim tendem a ser mais facilmente excretados (127,287). Portanto, são enzimas capazes de realizar a reação seguinte:



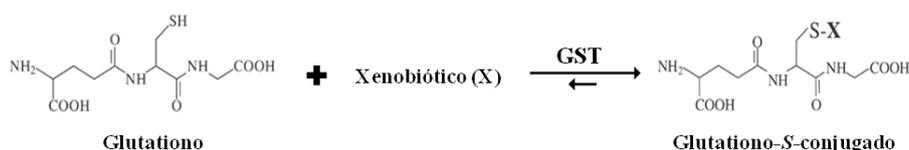
A atividade microsomal de UDPGT foi medida de acordo com Kane (1994) (288) e modificações propostas por outros autores (127,287,289), recorrendo ao p-nitrofenol (pNP) como substrato. As misturas de incubação continham alíquotas de fração microsomal hepática ou branquial (proteínas \approx 0,224 mg/mL e \approx 0,098 mg/mL), pré-tratada em gelo durante 5 min com Triton X-100 (0,4 %, v/v), tampão fosfato (0,1 M) a pH 7,4,

MgCl₂ (10 mM), pNP (600 μM) dissolvido em tampão fosfato (0,1M) e ácido UDP-glicurónico (2 mM). A reação foi iniciada a 25 °C adicionando o UDPGA e leu-se a absorvência a 405 nm durante 1200 s para determinar a diminuição da intensidade de cor devido à formação do conjugado pNP-glicuronilo. Os brancos foram preparados do mesmo modo substituindo o substrato por tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4).

O valor da atividade enzimática UDPGT foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares traçadas ao longo de 1200 s e utilizando o coeficiente de absorvidade molar de 16,03 M⁻¹cm⁻¹ para o pNP remanescente.

2.3.6.5. Glutathione S-transferase

A atividade da família de enzimas GST, que catalisa a conjugação de metabolitos endógenos e xenobióticos com o glutathione, foi determinada por espectrometria de absorção molecular de acordo com o método descrito por Habig (1974) (134), recorrendo a reação de conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno com o glutathione. Apesar de se tratar de uma reação reversível é no sentido em que se forma o conjugado 2,4-dinitrofenil S-glutathione, um cromóforo que absorve preferencialmente a 340 nm, que se dá em maior extensão, permitindo acompanhar a reação, pelo aumento da absorvência ao longo do tempo, conforme se encontra representado de seguida:

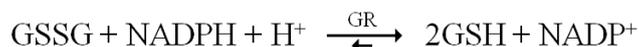


Em cada caso, incubou-se a 37 °C e sob agitação constante, durante 5 min alíquotas de fração microsomal e de citosol do fígado (proteínas ≈0,034 mg/mL e ≈0,080 mg/mL, respetivamente), e das brânquias (proteínas ≈0,108 mg/mL e ≈0,070 mg/mL, respetivamente), em células de absorção molecular que continham meio de reação constituído por GSH (1 mM) e tampão fosfato (0,1 M) pH 6,5. Deu-se início à reação pela adição de solução etanólica do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (1 mM) e registou-se a variação de absorvência a 340 nm, durante 120 s. As leituras foram realizadas contra um branco previamente preparado em que se substituiu o substrato por igual volume de etanol.

Calculou-se a atividade enzimática a partir do valor do coeficiente angular das retas obtidas e utilizou-se o valor do coeficiente de absorvidade molar $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ Habig (1974) (134) para o conjugado 2,4-dinitrofenol *S*-glutationo.

2.3.6.6. Glutationo redutase

A atividade glutatióno redutase encontra-se diretamente envolvida no ciclo do glutatióno, reduzindo o GSSG à forma tiólica (GSH), na presença de NADPH. A sua atividade específica foi determinada por espectrometria de absorção molecular, pelo registo do decréscimo de absorvência a 340 nm devido à oxidação do NADPH. Apesar de apresentar reversibilidade, o sentido em que esta reação ocorre em maior extensão é aquele que conduz à formação da forma tiólica do glutatióno, conforme mostra a reação seguinte (105,202,290):



De acordo com Goldberg (1987) (290) a atividade foi medida na mistura de reação constituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, EDTA (0,5 mM), GSSG (2 mM) e alíquotas de fração citosólica do fígado e das brânquias (proteínas $\approx 0,299 \text{ mg/mL}$ e $\approx 0,266 \text{ mg/mL}$), incubada durante 5 min a 37 °C. A reação foi então iniciada com adição de NADPH (0,15 mM), lendo-se a absorvência contra o branco, onde a amostra foi substituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,0.

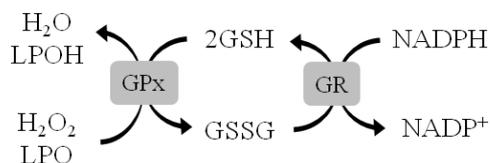
O valor da atividade GR foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do decréscimo da absorvência a 340 nm, ao longo de 300 s, a 37 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADPH.

2.3.6.7. Glutationo peroxidase

O enzima GPx catalisa a redução de lipoperóxidos e/ou o peróxido de hidrogénio a álcoois e água, acoplada à conversão de glutatióno em dissulfureto de glutatióno.

A determinação da atividade enzimática GPx, por espectrometria de absorção molecular, foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Flohé (1997, 1984) (291,292), que se baseia na oxidação do glutatióno e redução do peróxido de hidrogénio em

dissulfureto de glutationo e água, respetivamente, acontecendo em simultâneo o consumo de NADPH (164):

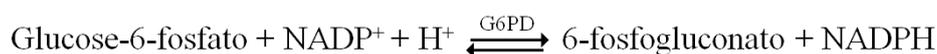


Preparou-se uma mistura de reação constituída por volume adequado de fração mitocondrial e citosólica do fígado (proteínas $\approx 0,048$ mg/mL e $\approx 1,849$ mg/mL, respetivamente), e das brânquias (proteínas $\approx 0,027$ mg/mL e $\approx 1,900$ mg/mL, respetivamente), e tampão fosfato (70 mM) pH 7,2, GSH (500 μ M), GR (12 mU) e NADPH (160 mM), a qual foi incubada durante 10 min a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de *ter*-butil-hidroperóxido (100 μ M) e monitorizada pela leitura, em contínuo, da absorvência a 340 nm contra um branco com composição semelhante, onde o volume de amostra foi substituído por tampão fosfato (70 mM) pH 7,0.

O valor da atividade GPx foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares traçadas pela leitura do decréscimo da absorvência a 340 nm, ao longo de 180 s, a 37 °C e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADPH.

2.3.6.8. Glucose-6-fosfato desidrogenase

O enzima G6PD, regulador da via das pentoses fosfato, catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, utilizando como cofator o NADP^+ . Assim, a atividade G6PD foi determinada por espectrometria de absorção molecular pelo incremento da absorvência a 340 nm devido à geração de NADPH, de acordo com Postma (1989) (164,293), como está representado de seguida:



Esta atividade enzimática foi determinada num volume adequado de fração citosólica dos tecidos hepático e branquial (proteínas $\approx 0,805$ mg/mL e $\approx 0,514$ mg/mL, respetivamente) recorrendo a alíquotas do sobrenadante pós 10000 g no meio de reação constituído por tampão tris-HCl (50 mM) pH 8,0 contendo NADP^+ (0,04 M), MgCl_2 (5 mM). A reação foi iniciada pela adição de glicose-6-fosfato (5 mM), após estabilização a 37 °C durante 60 s. Os

valores de absorvência foram registados contra um branco constituído pela mistura de reação e substituindo a amostra por igual volume de tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,0.

O valor da atividade G6PD foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, traçadas pela leitura do incremento da absorvência a 340 nm, ao longo de 180 s e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o NADPH.

2.3.6.9. Superóxido dismutase

Os enzimas SOD1 são os principais responsáveis pela conversão do radical anião superóxido em H_2O_2 e O_2 que ocorre no citoplasma e possivelmente dos peroxissomas. Por outro lado, os enzimas SOD2 protegem maioritariamente o mitocôndrio do radical $\bullet\text{O}_2^-$ gerado pelo metabolismo respiratório (174), catalisando ambos os enzimas a reação (105,202):



A determinação da atividade SOD1 e SOD2 foi realizada de acordo com o método descrito por Oberley em 1984 (294) recorrendo ao sistema xantina/NBT no qual o radical anião superóxido foi gerado pela conversão de xantina em ácido úrico e H_2O_2 , na presença de O_2 e de xantina-oxidase. A quantificação do produto cromogéneo NBT-diformazano resultante da redução do sal azul de tetrazólio (NBT), pelo radical $\bullet\text{O}_2^-$, proveniente da ação da xantina oxidase, permitiu de forma indireta, a determinação da atividade enzimática, uma vez que o enzima SOD, presente na amostra, compete com o NBT na oxidação do radical $\bullet\text{O}_2^-$ diminuindo a taxa de formação do cromóforo.

Assim, a determinação da atividade SOD foi realizada numa mistura de reação com amostra das frações mitocondrial e citosólica do fígado (proteínas $\approx 0,191 \text{ mg/mL}$ e $\approx 0,375 \text{ mg/mL}$, respetivamente) e das frações mitocondrial e citosólica das brânquias (proteínas $\approx 0,107 \text{ mg/mL}$ e $\approx 0,349 \text{ mg/mL}$, respetivamente) em tampão fosfato (35 mM) pH 7,8 contendo EDTA (0,1 mM), NBT (30 μM), BSA (0,5 %), xantina (0,1 mM), xantina oxidase (0,1 mU/mL). O branco foi determinado utilizando a mesma mistura de ensaio substituindo a amostra por tampão fosfato.

A atividade SOD presente na amostra foi calculada pela percentagem de inibição da taxa de formação de NBT-diformazano a partir do coeficiente angular das curvas de reação

lineares, traçadas pela leitura do decréscimo da absorvência a 560 nm, ao longo de 300 s, a 25°C, considerando que 1U corresponde à quantidade de enzima presente na amostra que causou 50% de inibição da taxa de redução do sal de azul de tetrazólio (NBT).

2.3.6.10. Catalase

Os enzimas CAT apresentam como principal função a decomposição do H₂O₂ em H₂O e O₂, podendo ser detetadas duas isoformas, a CTT1 de localização citoplasmática e a CTA1 de localização peroxissomal (295), de acordo com a equação (105,202):



A determinação desta atividade catalítica fez-se segundo o método desenvolvido por Beers, 1952 (296), acompanhando-se a degradação do H₂O₂ pelo enzima CTT1, pelo registo da variação de absorvência a 240 nm, a 25 °C durante 120 s, contra um branco constituído pelo meio de reação onde foi substituído o volume de amostra por igual volume de tampão fosfato (50 mM) pH 7,0. Utilizou-se em cada caso alíquotas de fração citosólica dos tecidos hepático e branquial (proteínas ≈0,159 mg/mL e ≈0,246 mg/mL, respetivamente), em meio de reação composto por tampão fosfato (50 mM) pH 7,0 e H₂O₂ (30 mM).

O valor da atividade catalase foi calculado a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares, utilizando o coeficiente de absorvidade molar de 0,0435 mM⁻¹.cm⁻¹ para o H₂O₂.

2.3.7. Análise estatística dos resultados

Os resultados experimentais são sempre influenciados pela incerteza das medições efetuadas e, no caso das experiências na área da bioquímica, pela variação biológica. A análise estatística dos resultados torna-se assim indispensável para conferir credibilidade à sua interpretação (297–299).

A estimativa da tendência central de uma série de determinações, bem como a sua variabilidade, constituem os resultados mais importantes da análise estatística que é fortemente influenciada pela dimensão da amostra, razão pela qual se optou por maximizar o número de indivíduos utilizados neste estudo, de acordo com a disponibilidade de animais em cada bacia e o respeito pelas leis de proteção animal (297–300).

As determinações biológicas seguem, em regra, uma distribuição de densidade de probabilidade gaussiana (Figura 2.7), podendo ser representadas graficamente, para variáveis

contínuas, por uma curva simétrica em forma de sino onde as ordenadas representam a frequência f ou a densidade dos valores que a variável x , representada no eixo das abcissas, pode tomar (Figura 2.7) (297–299).

A curva de distribuição gaussiana, ou curva normal de erros, pode ser caracterizada por dois parâmetros: a média aritmética (μ) que corresponde à abcissa do topo da curva, e o desvio-padrão (σ) que corresponde à distância da média ao ponto de inflexão. A média aritmética μ dos valores que a variável x_i pode assumir, bem como o desvio-padrão σ , para uma população com dimensão N , podem ser calculados pelas seguintes expressões (297–299):

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}}$$

As estimativas \bar{x} e s de μ e σ , definidas pelas expressões:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

onde \bar{x} corresponde à média dos i valores que a variável x pode assumir, podem ser calculadas a partir de uma amostra com dimensão n . Esta aproximação representa apenas de forma grosseira a distribuição da população que só tem significado para um número infinito de observações N , impossível de alcançar por razões orçamentais, de execução prática e das leis de proteção animal (297–299).

Contudo, o teorema do limite central diz-nos que, independentemente da dimensão n de cada amostra, as médias das amostras de uma população com distribuição gaussiana também terão uma distribuição gaussiana. Para além disso, este teorema refere ainda que quando a dimensão das amostras aumenta, as suas médias aproximam-se estritamente da distribuição gaussiana independentemente da distribuição da população, ou seja, mesmo quando a distribuição das observações individuais não seja gaussiana (297–299).

O desvio-padrão da média, tal como o desvio-padrão pode ser interpretado como uma medida da variabilidade, ou seja, da dispersão das médias das amostras, da mesma forma que o desvio-padrão é uma medida da dispersão de valores individuais de cada série de resultados. Assim sendo, o desvio-padrão da média traduz-se por ser uma medida do afastamento das médias dos desvio-padrão, podendo também ser considerado como um possível indicador das diferenças existentes entre as médias estatísticas das amostras. Então, o desvio-padrão da média pode ser utilizado como um indicador da variabilidade expectável da média das

amostras. Por outras palavras, a média das amostras funciona como uma estimativa mais precisa da média da população do que as observações individuais (297–299).

Apesar da média de uma série de valores de uma amostra aleatória constituir uma boa estimativa da média da população, o rigor dessa estimativa não é revelado uma vez que apenas se tem acesso à precisão com que foi determinada se o intervalo de confiança que lhe está associado for conhecido. Esse intervalo de confiança fornece uma ideia de quão afastada se encontra a média estatística da média tomada como verdadeira da população, definindo um limite superior e um limite inferior de variação. De acordo com esse raciocínio, deve-se procurar encontrar um valor superior e outro inferior à média da amostra, entre os quais existe uma certa probabilidade de encontrar o valor central das amostras de dimensão n seleccionadas na população (297–299).

Do ponto de vista teórico, a distribuição de frequência gaussiana alonga-se pelo eixo da variável x , desde infinitamente negativo até infinitamente positivo, podendo qualquer variável com distribuição gaussiana assumir qualquer valor nesse intervalo, embora seja raro alcançar valores que se afastem mais do que $\pm 3\sigma$ da média, para os quais as frequências relativas expectáveis são também muito pequenas. Este facto pode ser inferido a partir da equação que traduz a função de densidade de probabilidade da distribuição gaussiana:

$$Z = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left[\frac{(\bar{x} - \mu)}{\sigma} \right]^2}$$

Esta equação mostra que para valores muito grandes ou muito pequenos da variável x , o termo $\frac{1}{2}[(\bar{x}-\mu)/\sigma]^2$ assume valores muito elevados e conseqüentemente a exponencial negativa desse termo e Z tomarão valores muito pequenos. Deste modo, é possível gerar tabelas onde os valores de Z se encontram ordenados em função da distância à média em unidade de desvio-padrão que permitem definir os limites (Figura 2.7) (297,298):

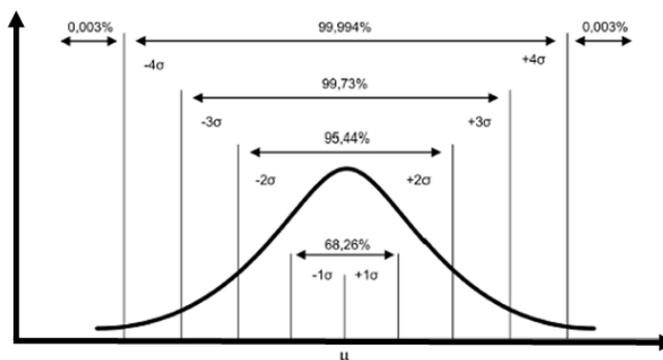


Figura 2.7 - Representação gráfica da curva de Gauss (adaptado de Sokal, 2009) (297)

Assim, para uma população com média paramétrica (μ), desvio-padrão (σ) e desvio padrão da média (σ/\sqrt{n}), a equação da função de densidade de probabilidade dessa distribuição permite considerar que o intervalo $\mu \pm 1,96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ inclui 95% das médias da amostra \bar{x} de dimensão n , ou seja, que o desvio-padrão da média da amostra segue uma distribuição gaussiana e que 95% do seu valor se localizará entre -1,96 e +1,96, admitindo que, de acordo com o teorema do limite central, as médias da amostra também seguem uma distribuição gaussiana.

Considerando que o desvio-padrão da média de uma amostra em relação à média paramétrica da população pode ser expresso pela razão $(\bar{x} - \mu) / \sigma / \sqrt{n}$, pode-se reescrever a afirmação do seguinte modo:

$$P \left\{ -1,96 \leq \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma / \sqrt{n}} \leq +1,96 \right\} = 0,95$$

Generalizando, ter-se-á então:

$$P \left\{ \bar{x} - \mu_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + \mu_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right\} 1 - \alpha = \gamma$$

onde as desigualdades entre chavetas têm a designação de limites de confiança e o símbolo γ correspondente ao coeficiente de confiança, isto é, que a probabilidade $P = \gamma$ dos termos serem respetivamente inferior ou igual e maior ou igual ao valor da média paramétrica μ (297,298).

$$\bar{x} - \mu_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, L_1 \quad \text{e} \quad \bar{x} + \mu_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, L_2$$

Os desvios entre a média estatística e a média paramétrica de uma distribuição gaussiana ($\bar{x} - \mu$) também seguem uma distribuição gaussiana. O quociente entre esses desvios e o desvio-padrão paramétrico $((\bar{x} - \mu) / \sigma)$ também segue uma distribuição gaussiana.

O cálculo da variância estatística S_i^2 e $(\bar{x}_i - \mu) / s$, onde S estima o desvio-padrão da média de i amostras, tendo em conta o desvio de cada média estatística, relativamente à média paramétrica, permite descobrir que a distribuição dos desvios é mais ampla e favorável do que a distribuição gaussiana. Esta nova distribuição expectável da razão $(\bar{x}_i - \mu) / s$, conhecida como distribuição t de *students*, tem um intervalo de variação superior ao da distribuição gaussiana, uma vez que utiliza como denominador o desvio-padrão da amostra, em vez do desvio-padrão paramétrico (297–299). A distribuição t possui propriedades de simetria e de expansão idênticas à distribuição gaussiana, variando desde infinitamente negativo até infinitamente positivo, mas pode assumir diferentes formas que dependem dos graus de

liberdade que podem variar desde 1 até ao infinito. Esta distribuição quando assume o valor 1 desvia-se acentuadamente da distribuição gaussiana, mas à medida que o número de graus de liberdade aumenta, aproxima-se da forma dessa distribuição (297,298). Os limites de confiança da distribuição de *t* de *students* podem ser estimados pela equação:

$$P \left\{ L_1 \leq \mu \leq L_2 \right\} = P \left\{ \bar{x} - t_{\alpha [n-1]} s_{\bar{y}} \leq \mu \leq \bar{x} + t_{\alpha [n-1]} s_{\bar{y}} \right\} = 1 - \alpha$$

Contudo, as publicações científicas utilizam frequentemente o desvio-padrão da média como medida útil da confiança estatística de uma amostra, em vez dos limites de confiança (297–299).

Assim, quando se pretende testar se a média estatística de duas ou mais amostras tiveram origem em populações com a mesma média paramétrica procede-se à análise de variância (ANOVA), desenvolvida por Fisher, embora o teste *t*, mais restritivo, seja frequentemente utilizado para determinar diferenças estatísticas apenas entre duas amostras. Por outras palavras, a ANOVA corresponde ao procedimento estatístico que permite analisar a forma como a média de uma variável é perturbada por diferentes tipos e combinações de fatores (301). Quando se compara um número elevado de amostras recomenda-se a aplicação da análise de variância simples (ANOVA I) que tal como qualquer análise de variância, permite comparar sempre *a* amostras ou grupo de *n* replicados, obtendo-se estimativas da variância da população a partir da soma dos quadrados de cada grupo recorrendo à expressão matemática (297–299):

$$s^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2$$

Contudo, pode-se efetuar uma melhor estimativa da variância recorrendo ao cálculo da média pesada da variância pela equação geral onde a variância de cada amostra s_i^2 é afetada pelos graus de liberdade $w_i = n_i - 1$ recorrendo à equação:

$$\frac{1}{a(n-1)} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

que constitui uma estimativa da variância no interior dos grupos, termo que estima a dispersão em cada grupo individualmente, considerando que todos os grupos são igualmente variáveis englobando a variação em todos eles (297,299).

Outra estimativa da variância da população pode ser calculada eliminando as fronteiras entre os grupos, tomando as médias \bar{x} dos a grupos como observações de uma amostra e recorrendo à expressão matemática:

$$\frac{1}{a-1} \sum_{i=1}^{i=a} n_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2$$

designada por variância entre grupos i e corresponde a n x a variância das médias. A multiplicação pela dimensão das amostras n_i confere a cada grupo um peso proporcional à informação que fornece da situação. O número de graus de liberdade ($a-1$) representa a quantidade de replicados a que se tem acesso. Esta segunda estatística da variância não se encontra tão próxima do valor tomado como verdadeiro, ou seja, a obtida pela primeira aproximação baseada na variância média dentro dos grupos.

O acesso a estes dois estimadores independentes da variância da população possibilita testar se verdadeiramente estimam o mesmo parâmetro. A concretização desse objetivo alcança-se recorrendo à função de distribuição F, onde, o quociente $F_x = s_1^2 / s_2^2$ deverá ser próximo de 1

se as variâncias estatísticas estimarem o mesmo parâmetro. A distribuição F depende de dois tipos de graus de liberdade σ_1 e σ_2 . Quando o número de graus de liberdade é muito baixo, a distribuição toma a forma de L. Porém, à medida que esse valor aumenta a distribuição converte-se numa curva com máximo deslocado para a direita. Assim podem ser geradas tabelas da distribuição F que apresentam a função da distribuição cumulativa para vários valores de probabilidade selecionados (297–299).

Ao testar-se a hipótese nula $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$, compara-se o valor de F crítico, por leitura ou interpolação da tabela, com o valor de F estatístico, calculado pelo quociente da variância entre grupos pela variância no interior dos grupos. Quando o valor do F estatístico supera o valor crítico da tabela, rejeita-se a hipótese nula de as médias dos grupos estimarem populações idênticas e conclui-se que existem diferenças entre eles. Se acontecer o contrário, não se pode considerar que as diferenças sejam estatisticamente significativas e aceita-se a hipótese nula (297–299).

Quando o teste F permite descobrir diferenças significativas entre grupos, passa-se para a segunda fase de análise de variância com o objetivo de discriminar os grupos que diferem significativamente entre si. Sendo assim, a média estatística de cada grupo pode ser comparada com a média estatística dos outros grupos de uma dada experiência, aplicando-se testes de comparação de pares ou de comparação de grupos. Esses testes são semelhantes aos

que são aplicados para comparar dois grupos pelo teste t, mas nesse recorre-se a estimativas de dispersão em *pools* de todos os grupos, mesmo quando só se comparam dois grupos, uma vez que a estimativa em *pools* de variância é um teste mais sensível. Partindo desse pressuposto, calcula-se o desvio-padrão do *pool* e o seu número adequado de graus de liberdade para se aceitar que a média de dois grupos particulares diferem significativamente (297–299).

Em investigação biológica aplica-se o teste de significância (LSD) à comparação planeada de pares quando o número de tratamentos é pequeno e o teste de comparação múltipla de Duncan (DMRT) quando o número de tratamentos e de controlos é elevado, como aconteceu nas experiências descritas neste trabalho (297–299). O teste inclui o cálculo de fronteiras numéricas ou intervalos de confiança que permitam considerar como significativas ou não as diferenças observadas entre quaisquer duas médias de tratamentos (297–299). Para tal, ordenam-se as médias estatísticas de todos os tratamentos por ordem crescente ou decrescente do seu valor e calcula-se o valor do desvio-padrão da média $S\bar{d}$ aplicando a fórmula:

$$S\bar{d} = \sqrt{\frac{2s^2}{n}}$$

calculando-se posteriormente (a-1) intervalos de confiança pela expressão:

$$R_p = \frac{(r_p)(S\bar{d})}{\sqrt{2}}$$

para $p = 2, 3 \dots a$, em que a corresponde ao número total de tratamentos, $S\bar{d}$ ao desvio-padrão da média das médias já calculadas e r_p aos valores tabelados dos intervalos de confiança da distribuição de “*t-student*” dependentes da posição de ordenação p de cada média estatística e de $a(n-1)$ graus de liberdade. Após determinação dos intervalos R_p , calcula-se a diferença entre a média estatística mais elevada e o maior valor de R_p , ou seja, o valor de R_p , em que $p = t$, que será comparado com os valores das outras médias estatísticas. Caso as médias estatísticas sejam inferiores a essa diferença, consideram-se significativamente diferentes da média estatística mais elevada. Repetem-se os passos anteriores até se compararem todos os pares de grupos em estudo (302,303).

A aplicação da análise estatística leva a resultados mais ou menos prováveis e consequentemente, a leitura teórica dos testes de hipótese descritos anteriormente podem determinar dois tipos de erros: I - rejeição de uma hipótese nula verdadeira ou II - aceitação de uma falsa hipótese nula. O segundo tipo de erro é de difícil controlo, uma vez que depende

da exatidão com que as médias estatísticas das amostras estimam a média das populações, informação a que não se consegue aceder. Como o estágio de agrupamento implica a deteção de diferenças significativas pelo teste F, a combinação de ambos os procedimentos promove um certo controlo sobre os erros do tipo I com um nível de significância α . Por outras palavras, caso não existam, de facto, diferenças entre as médias dos grupos da população, as conclusões de uma determinada experiência são erradas e apenas $\alpha\%$ das vezes é que se encontram diferenças significativas entre eles. Portanto, o erro tipo I pode ser controlado a $\alpha\%$ da extensão em que os erros ocorrem numa determinada situação (302,303).

Neste estudo, os resultados estatísticos foram apresentados em quadros ou gráficos de forma a providenciar uma visão geral dos mesmos simples e rápida. As representações incluem curvas com escala aritmética e gráficos de barras. Em cada gráfico, foram incluídos título e legenda explicativa da natureza e origem dos resultados. As coordenadas são as menores possíveis, encontrando-se as unidades assinaladas com clareza. No que diz respeito aos gráficos de barra, o comprimento é proporcional ao valor absoluto da componente que representa enquanto a espessura é arbitrária, conforme recomendado em Sokal (1981, 2009) (297,298).

Utilizou-se a média aritmética dos *pools* como estatística de localização, razão pela qual foram sempre utilizados resultados com precisão o mais semelhante possível. O desvio-padrão da média foi utilizado como medida da dispersão dos resultados, uma vez que permite quantificar o afastamento das médias dos valores das médias dos *pools* relativamente à média da população, formando assim uma estimativa mais precisa da média da população do que as observações de cada *pool* (297,298).

Calculou-se a variância entre grupos, no interior dos grupos e total (s^2) para todos os grupos em estudo, tendo em vista ficar com uma ideia acerca da variação individual e do erro experimental. Aceitaram-se as diferenças como significativas, negando a hipótese nula $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ nos casos em que o valor do F estatístico, o quociente da variância entre grupos pela variância no interior dos grupos, excedeu o valor crítico de F (tabelado), para os respetivos graus de liberdade, com o nível de significância de 95% (302,303) (Anexo A).

A discriminação dos grupos com diferenças significativas foi alcançada aplicando o teste de Duncan, assumindo que as diferenças entre os grupos são devidas aos tratamentos fixos (302,303).

As representações gráficas e os cálculos apresentados neste estudo foram executados utilizando os programas *Excel* 2016 e *SPSS* (versão 22) para o Windows10, licenciados pela Microsoft para a Universidade de Évora.

2.4. Equipamento

- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200
- Balança técnica da marca Mettler, modelo PJ 3000
- Banho termostático com agitação da marca Memmert, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca Aquatron, modelo A 4D
- Equipamento para pesca elétrica da marca Hans Grassl, modelo EL 62 gerador DC, 600 V
- Espectrômetro de absorção molecular de feixe simples, marca GENESYS 10S UVVis
- Espectrômetro de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2001, com banho termostático e sistema de circulação de água da marca Grant.
- Espectrômetro de fluorescência de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Homogeneizador de tipo Potter, da marca TRI-R STIR-R, Model K41
- Lupa estereoscópica da marca Leitz Dialux 20 microscópica com câmara Leica DC 300
- Placa de agitação da marca Labinco, modelo L34
- Potenciômetro da marca Metrohm, modelo 691
- Supercentrifuga da marca Hermle, modelo Z323 K
- Ultracentrifuga, da marca Beckman Optima LE-80K
- Vortex da marca Heidolph, modelo Reax 2000

2.5. Reagentes

- 1,1,3,3-tetrametoxipropano, 96,0%, Sigma, St. Louis
- 1-butanol, 99,5 %, Panreac, Barcelona
- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, 97,0%, Sigma, St. Louis
- 2,4-dinitrofenil-S-glutationo, 97,0%, Sigma, St. Louis
- 2',7'-diclorofluoresceína, 90,0%, Sigma, St. Louis
- 6-fosfogluconolactona, 90,0%, Sigma, St. Louis
- 7-etoxicumarina, 99,5%, Sigma, St. Louis
- 7-hidroxycumarina, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Ácido D,L-isocítrico, 99,0%, Sigma, St.Louis
- Ácido etilenodiaminotetracético, 99,0%, Sigma, St.Louis
- Ácido tiobarbitúrico, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Ácido UDP-glicurónico, 98,0%, Sigma, St.Louis
- Albumina do soro bovino, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Azul de tetrazólio, 99%,0, Merck, Darmstadt
- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5 %, Merck, Darmstadt
- Cianeto de potássio, 99,0%, Merck, Darmstadt
- Citocromo c, 99,0%, Merck, Darmstadt
- Cloreto de magnésio, 99,0 %, Sigma, St.Louis

- Cloreto de potássio, 99,5 %, Merck, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Dinucleótido de nitotinamida e adenina (forma oxidada) pró análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Dinucleótido de nitotinamida e adenina (forma reduzida) pró análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Ditionito de sódio, 99%, Merck, Darmstadt
- Duodecilsulfato de sódio, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Ferricianeto de potássio, 99,0%, Merck, Darmstadt
- Fosfato de dinucleótido de nitotinamida e adenina (forma oxidada) 98,0%, Sigma St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nitotinamida e adenina (forma reduzida), 98,0 %, Sigma St. Louis
- Glicina, 99,0 %, Riedel-de Haën, Seelze
- Glicose-6-fosfato desidrogenase, 99,0 %, Sigma, St.Louis
- Glutationo dissulfureto, pró análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Glutationo redutase, Sigma, St.Louis
- Glutationo, pró análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Hidróxido de bário, pró análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Hidróxido de sódio, pró análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Isocitrato desidrogenase, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- N-etilmaleimida, 90,0%, Sigma, St. Louis
- *o*-ftalaldeído, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Peróxido de hidrogénio, pró análise, 30,0 %, Sigma, St. Louis
- Piridina, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- p-nitrofenilfosfato, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- p-nitrofenol, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteau, pró análise, Sigma, St. Louis
- Sal sintético comercial, Coral Pro Sea, Red Sea, Verneuil s/Avre
- Sulfato de cobre penta-hidratado, pró análise, 102,9 %, Panreac, Barcelona
- Sulfato de magnésio hepta-hidratado, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- t-butil hidroperóxido, 70,0%, Sigma, St. Louis
- Tris(hidroximetil)aminometano, pró análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- Triton X-100, 98,0%, Merck, Darmstadt
- Xantina oxidase, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Xantina, 99,5%, Sigma, St. Louis

Capítulo 3

Resultados e Discussão

A leitura e discussão dos resultados obtidos neste estudo foram dirigidas para avaliar o sucesso do recrutamento de populações de *P. marinus* de bacias hidrográficas portuguesas, em termos de parâmetros morfométricos, conteúdos e atividades enzimáticas de sistemas de biotransformação, bem como conteúdos e atividades enzimáticas marcadores de resposta ao *stress* por juvenis de lampreia-marinha na fase de migração trófica. Este capítulo reporta os quatro momentos em que o estudo se subdividiu e inclui a: i) caracterização da resposta à salinidade por animais das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego; ii) caracterização detalhada da resposta à salinidade por animais das bacias do Lima e Vouga; iii) caracterização da resposta à atrazina por animais em ambiente dulçaquícola, por animais da bacia do Lima; iv) caracterização da resposta à atrazina em ambiente salino, por animais da bacia do Lima.

3.1. Caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I)

Os resultados abordados neste sub-capítulo integram o estudo prévio da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha, oriundos de quatro bacias hidrográficas portuguesas (Ensaio I), expresso em termos de evolução de parâmetros morfométricos, de conteúdos e de enzimas pertencentes a sistemas de biotransformação e/ou de resposta ao *stress* oxidativo.

Neste ensaio, juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego foram organizados em três grupos de tratamentos distintos, conforme previamente descrito no sub-capítulo 2.3. e designados por: (1) “controlo à chegada”; (2) “controlo do ensaio” e (3) “exposto ao sal”.

A caracterização morfométrica aqui descrita avalia parâmetros como o comprimento total (TL), peso corporal (TW), peso do fígado (LW), peso das brânquias (GW), índice hepato-somático (HSI), índice branquio-somático (GLSI), e fator de condição de Fulton (K).

A caracterização bioquímica inclui o conteúdo em hemo e as atividades enzimáticas CPR e ECOD microssomais hepáticas, as atividades enzimáticas mGST e UDPGT da fração microssomal hepática e branquial, as atividades enzimáticas GST do citoplasma hepático e branquial, envolvidos em processos de biotransformação. Por outro lado, são também apresentados e discutidos marcadores de *stress* oxidativo hepáticos e branquiais como os conteúdos em GSH, GSSG, tióis totais não proteicos (GSH+GSSG), ROS e MDA, razão GSH/GSSG e as atividades enzimáticas GR, GPx, G6PD e CTT1.

3.1.1. Biometria

O comprimento dos juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego variou entre 142 e 162 mm, valores muito próximos dos descritos na literatura, para o mesmo período de captura e temperatura média da água (Quadro 3.1) (10,15,270,304). O referido quadro revela também que os juvenis capturados na bacia do Mondego apresentavam à chegada comprimento superior ao dos efetivos capturados em qualquer das bacias hidrográficas selecionadas para este ensaio. Contudo, o comprimento que os animais provenientes das bacias do Minho e Vouga apresentavam à chegada era superior ao dos animais oriundos da bacia do Lima, não diferindo entre si ($p < 0,05$). O Quadro 3.1 permite ainda observar que durante o cativeiro em tanque, com ou sem exposição ao gradiente salino, não ocorreram alterações significativas no comprimento dos juvenis de qualquer das bacias eleitas para este ensaio ($p < 0,05$). O perfil de comprimento dos animais capturados em cada bacia permaneceu assim idêntico ao perfil detetado no início das experiências, pelo que, pode-se inferir que a exposição ao gradiente de salinidade 35 não perturbou este parâmetro morfométrico.

Quadro 3.1 – Parâmetros morfométricos de juvenis de lampreia-marinha das bacias hidrográficas do Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro) do Ensaio I no grupo controlo à chegada (Grupo 1) e nos grupos de controlo do ensaio (Grupo 2) e submetidos a uma escala crescente e gradual de salinidade 35, ao longo de 28 dias (Grupo 3). Os resultados representam a média de 40 animais em cada grupo \pm erro padrão da média. As médias de uma mesma coluna assinaladas com letras diferentes (a-g) são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

Bacia	Grupos	S	TL (mm)	TW (g)	LW (g)	HSI (%)	GW (g)	GLSI (%)	K
Minho	1	0	155 \pm 1,7 ^{ab}	5,59 \pm 0,16 ^{ab}	0,0431 \pm 0,0014 ^{ab}	0,77 \pm 0,01 ^a	0,1144 \pm 0,0041 ^a	2,05 \pm 0,05 ^a	0,43 \pm 0,00 ^a
	2	0	153 \pm 1,5 ^a	5,22 \pm 0,14 ^{ac}	0,0390 \pm 0,0012 ^{acd}	0,75 \pm 0,02 ^a	0,0906 \pm 0,0049 ^b	1,73 \pm 0,08 ^{bf}	0,42 \pm 0,01 ^a
	3	35	153 \pm 1,7 ^a	4,97 \pm 0,15 ^{cd}	0,0366 \pm 0,0012 ^{cd}	0,74 \pm 0,02 ^a	0,0666 \pm 0,0028 ^c	1,34 \pm 0,03 ^{de}	0,40 \pm 0,00 ^b
Lima	1	0	146 \pm 1,4 ^c	4,58 \pm 0,13 ^{de}	0,0235 \pm 0,0011 ^f	0,51 \pm 0,02 ^b	0,0544 \pm 0,0022 ^d	1,20 \pm 0,04 ^{de}	0,29 \pm 0,00 ^c
	2	0	143 \pm 1,7 ^c	4,31 \pm 0,12 ^e	0,0285 \pm 0,0011 ^g	0,67 \pm 0,02 ^c	0,0679 \pm 0,0026 ^c	1,58 \pm 0,05 ^{cf}	0,29 \pm 0,00 ^c
	3	35	142 \pm 1,8 ^c	4,47 \pm 0,15 ^e	0,0353 \pm 0,0016 ^{de}	0,79 \pm 0,02 ^a	0,0795 \pm 0,0032 ^e	1,79 \pm 0,06 ^{bg}	0,30 \pm 0,00 ^d
Vouga	1	0	151 \pm 1,8 ^a	5,01 \pm 0,17 ^{cd}	0,0388 \pm 0,0016 ^{acd}	0,78 \pm 0,02 ^a	0,0774 \pm 0,0039 ^{ce}	1,54 \pm 0,06 ^f	0,27 \pm 0,00 ^{ef}
	2	0	152 \pm 1,9 ^a	5,24 \pm 0,16 ^{ac}	0,0409 \pm 0,0017 ^{abc}	0,78 \pm 0,02 ^a	0,1005 \pm 0,0045 ^{bf}	1,91 \pm 0,06 ^{ag}	0,28 \pm 0,00 ^{ce}
	3	35	156 \pm 1,8 ^{abd}	5,26 \pm 0,20 ^{ac}	0,0344 \pm 0,0018 ^e	0,65 \pm 0,02 ^c	0,0722 \pm 0,0034 ^{ce}	1,38 \pm 0,04 ^e	0,26 \pm 0,00 ^g
Mondego	1	0	161 \pm 1,9 ^{de}	6,53 \pm 0,19 ^f	0,0402 \pm 0,0014 ^{acd}	0,62 \pm 0,01 ^c	0,0802 \pm 0,0027 ^e	1,25 \pm 0,04 ^{de}	0,29 \pm 0,00 ^{ce}
	2	0	160 \pm 1,3 ^{bde}	5,99 \pm 0,16 ^b	0,0449 \pm 0,0015 ^{abc}	0,75 \pm 0,02 ^a	0,1070 \pm 0,0038 ^{af}	1,80 \pm 0,05 ^{bg}	0,27 \pm 0,00 ^{fg}
	3	35	162 \pm 1,8 ^e	6,03 \pm 0,18 ^b	0,0479 \pm 0,0015 ^e	0,80 \pm 0,02 ^a	0,1029 \pm 0,0045 ^f	1,71 \pm 0,06 ^{bf}	0,26 \pm 0,00 ^g

Salinidade (S), comprimento corporal (TL), peso corporal (TW), peso do fígado (LW), índice hepato-somático (HSI), peso das brânquias (GW), índice branquio-somático (GLSI) e fator de condição de Fulton (K).

O peso corporal dos juvenis capturados nas bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego variou entre 4,31 e 6,53 g, valores muito semelhantes aos descritos pela literatura para a mesma época de captura e temperatura média da água (Quadro 3.1) (10,15,49,304). O referido quadro mostra também que o peso corporal à chegada dos juvenis capturados na bacia do Mondego era significativamente superior ao dos animais capturados

nas restantes bacias eleitas para este ensaio. No entanto, os efetivos oriundos da bacia hidrográfica do Minho exibiam peso corporal superior ao dos efetivos provenientes das bacias do Lima e do Vouga cujo peso do corpo não apresentava diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$). Por outro lado, observou-se um decréscimo significativo do peso corporal dos juvenis oriundos das bacias do Minho e Mondego, mantidos em cativeiro ou expostos ao gradiente de salinidade 35 em cativeiro, comparativamente com o que foi registado nos animais do grupo controlo à chegada ($p < 0,05$). Esta resposta poderá estar relacionada com o jejum em que foram mantidos em cativeiro ou com perda osmótica de água para o meio circundante devido maioritariamente ao *stress* salino (23). No entanto, a permanência em cativeiro de juvenis lampreia-marinha capturados nas bacias do Lima e do Vouga, com ou sem exposição ao sal, não provocou qualquer alteração significativa do seu peso do corporal. Após a aclimação ao sal, os juvenis capturados na bacia do Mondego apresentavam o peso corporal mais elevado, seguindo-se os animais das bacias do Minho e Vouga com peso intercalar, e no limite inferior os juvenis da bacia do Lima (Quadro 3.1) ($p < 0,05$). As diferenças de peso observadas em cada bacia espelham, provavelmente, o nível de reservas lipídicas que acumularam enquanto filtradores, vitais para assegurar a sua sobrevivência durante a migração trófica (3,23,29,259,305).

O peso do fígado de juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego variou entre 0,0235 g e 0,0479 g, valores muito próximos dos descritos na literatura para lampreia-marinha (15,258), e outros animais aquáticos como a *Cyprinus carpio* (266) ou a *Tilapia mossambica* (255).

O peso do fígado dos animais das bacias do Minho, Vouga e Mondego pertencentes ao grupo controlo à chegada, não apresentavam diferenças significativas (Quadro 3.1). Todavia, esses valores eram superiores aos detetados em juvenis da bacia do Lima ($p < 0,05$). Estes resultados apontam para uma maior acumulação de materiais de reserva, nomeadamente lípidos, pelos juvenis das bacias do Minho, Vouga e Mondego até ao início da metamorfose, essencial para garantir o sucesso da migração trófica. Este facto poderá, em parte, ser devido à presença de menor quantidade de matéria orgânica na bacia do Lima, no Outono de 2010 (262). O Quadro 3.1 revela ainda que o peso do fígado dos animais provenientes da bacia do Minho, expostos ao gradiente de salinidade 35 em cativeiro, diminuiu significativamente em relação ao determinado nos animais do grupo controlo à chegada. Como não se detetaram alterações significativas entre os animais controlo do ensaio e os animais expostos ao gradiente de salinidade, pode-se especular que a resposta observada deveu-se maioritariamente à exposição ao sal. O peso do fígado (Quadro 3.1) dos animais capturados

na bacia do Vouga e mantidos em gradiente de salinidade mostrou-se significativamente inferior ao de qualquer dos controlos, pelo que a exposição ao sal parece ter sido determinante no decréscimo do peso do órgão. Por outro lado, na bacia do Lima detetou-se um aumento do peso do fígado dos juvenis mantidos em cativeiro, pertencentes ao grupo exposto à salinidade e respetivo controlo do ensaio. No entanto, o valor mais elevado foi detetado nos animais sujeitos ao gradiente de salinidade 35 ($p < 0,05$). Um perfil de resposta idêntico parece ter ocorrido nos animais da bacia do Mondego. Contudo, não foram detetadas diferenças significativas no peso do órgão entre os juvenis expostos à salinidade e o seu respetivo controlo do ensaio. Assim, o efeito exercido pelo aumento gradual da salinidade no fígado de juvenis das bacias do Lima e Mondego mostrou-se oposto ao detetado nas bacias do Minho e do Vouga.

O índice hepato-somático (HSI) de juvenis de lampreia-marinha provenientes das bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego variou entre 0,51 e 0,80 (Quadro 3.1) intervalo correspondente à ordem de grandeza encontrada na literatura para juvenis de lampreia-marinha (15,258) e de outros animais marinhos como a *Cyprinus carpio* (266) ou a *Tilapia mossambica* (255).

O índice hepato-somático de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho e Vouga, pertencentes ao grupo controlo à chegada, não diferiam entre si ($p < 0,05$). Contudo eram superiores aos detetados nos efetivos das bacias do Mondego e do Lima, sendo o menor valor detetado nesta última bacia (Quadro 3.1) ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem que os animais das bacias do Lima e Mondego poderão ter iniciado a metamorfose um pouco mais cedo do que os juvenis das bacias do Minho e Vouga. O Quadro 3.1 revela também que o cativeiro ou a exposição ao gradiente de salinidade 35 em cativeiro não provocaram alterações significativas no índice hepato-somático dos juvenis provenientes da bacia do Minho ($p < 0,05$). No entanto, o cativeiro e a exposição ao sal provocaram um aumento do HSI nos animais da bacia do Lima atingindo valores estatisticamente próximos dos detetados nos juvenis das bacias do Minho e Mondego. Um resultado intrigante foi observado em juvenis provenientes da bacia do Vouga onde o HSI dos efetivos sujeitos ao gradiente de salinidade diminuiu face ao respetivo controlo do ensaio e controlo à chegada ($p < 0,05$). Este indicador de perturbações no crescimento, devido a mobilização energética de reservas nutricionais ou a hepato-toxicidade, nos animais provenientes da bacia do Vouga, poderá ser explicado pela: i) elevada mobilização de reservas energéticas durante a exposição ao gradiente de salinidade 35; e ou ii) perda de funções hepáticas determinadas pelo contacto com poluentes no período

que antecedeu a sua captura que se manifestaram durante a adaptação à salinidade e que podem comprometer o sucesso da migração trófica (306).

O peso das brânquias de juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego variou entre 0,0544 e 0,1144 g (Quadro 3.1), intervalo de variação próximo da ordem de grandeza encontrada na bibliografia consultada para outros animais aquáticos (307). O referido quadro mostra também que à chegada, o peso das brânquias dos animais da bacia do Minho era superior ao de qualquer animal das bacias estudadas, apresentando os juvenis da bacia do Lima o menor valor ($p < 0,05$). Embora, à chegada, o peso das brânquias dos animais oriundos das bacias do Vouga e do Mondego não diferissem entre si, eram significativamente superiores aos determinados nos efetivos da bacia do Lima. O Quadro 3.1 revela ainda que o peso das brânquias dos juvenis provenientes da bacia do Minho e expostos ao gradiente de salinidade 35 era significativamente inferior ao do respetivo controlo do ensaio, sendo ambos inferiores ao do grupo controlo à chegada. Apesar do peso das brânquias dos animais capturados na bacia do Vouga ter aumentado com o cativeiro, aqueles que foram sujeitos ao gradiente de salinidade 35 exibiram um decréscimo significativo do peso do órgão, apresentando um perfil de resposta idêntico ao detetado na bacia do Minho. No entanto, o peso das brânquias dos juvenis pertencentes ao grupo controlo do ensaio, provenientes das bacias do Lima e do Mondego aumentou com o cativeiro, sendo mais elevado nos animais da bacia do Mondego ($p < 0,05$). Por outro lado, as brânquias dos animais provenientes da bacia do Mondego apresentavam o peso mais elevado entre os juvenis expostos ao gradiente de salinidade 35. Embora o peso das brânquias dos juvenis da bacia do Vouga não diferisse do determinado nos animais das bacias do Lima e Minho, estes últimos apresentavam peso branquial inferior ao determinado nos efetivos da bacia do Lima expostos ao gradiente de salinidade 35 ($p < 0,05$).

O índice branquio-somático determinado em juvenis de lampreia-marinha oriundos das bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego variou entre 1,20 e 2,05. A partir do Quadro 3.1 pode observar-se que o referido índice dos efetivos capturados nas quatro bacias seguiu um perfil idêntico ao descrito anteriormente para o peso das brânquias. No referido quadro pode ainda constatar-se que a exposição ao gradiente de salinidade 35 contribuiu para um decréscimo da dimensão das brânquias relativamente ao peso corporal apenas nos animais das bacias do Minho e Vouga. Considerando que o aumento da tolerância à salinidade por juvenis de lampreia-marinha encontra-se correlacionado com o desenvolvimento de células ricas em mitocôndrios (ICC) e células clorídricas (CC) branquiais inequivocamente descrita para juvenis diferenciados (44,259,305,308), o decréscimo do

parâmetro GLSI poderá ser um provável indicador de debilidade no desenvolvimento/crescimento branquial dos efetivos destas bacias comprometendo o sucesso da sua migração trófica.

O fator de condição Fulton (K) de juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias hidrográficas do Minho, Lima, Vouga e Mondego variou entre 0,26 e 0,43, valores muito próximos dos descritos na literatura para *transformers* oriundos das mesmas bacias (Quadro 3.1) (15). O referido quadro, permite também observar que os animais oriundos da bacia do Minho apresentavam à chegada, o valor mais elevado do fator K. Embora não se tenham detetado, à chegada diferenças significativas entre o fator K de juvenis do Mondego, Lima e Vouga, os efetivos do Vouga possuíam um valor inferior ao determinado para os animais da bacia do Lima ($p < 0,05$). Estes resultados estão de acordo com o que foi descrito por Almeida (2008) (15) que observou um aumento do parâmetro K com a latitude da bacia. Este parâmetro biométrico assumiu valores dentro do intervalo observado por Almeida (2008) (15) para *transformers* em fase final de metamorfose, sendo um pouco inferiores aos calculados pelo mesmo autor para os animais da bacia do Minho. A partir do Quadro 3.1 pode ainda observar-se que as condições de cativeiro na ausência de sal não afetaram o parâmetro K dos animais capturados nas bacias do Minho, Lima e Vouga, embora tenha ocorrido um decréscimo significativo nos animais do Mondego. A exposição ao gradiente de salinidade 35 provocou ainda um decréscimo do fator de condição K nos animais das bacias do Minho e do Vouga, não afetou os animais do Mondego e provocou um aumento significativo nos animais do Lima. A aclimação ao sal levou a que os animais das bacias do Minho e do Lima apresentassem um fator de condição K significativamente superior ao dos animais das bacias do Vouga e Mondego sendo determinado nos animais da bacia do Minho os valores de K mais elevados. Como a lampreia-marinha em metamorfose não se alimenta, é sedentária e exibe baixa taxa metabólica até ao final da migração trófica, o fator K diminui à medida que a metamorfose progride (269). Tal como o que foi descrito para a evolução do parâmetro HSI, as diferenças entre fatores de condição K de juvenis das bacias do Minho e Lima e juvenis das bacias de Vouga e Mondego permite inferir que o melhor estado nutricional dos animais das bacias hidrográficas do Minho e do Lima no final do gradiente de salinidade 35, indicia para esses animais maior sucesso na migração trófica (Quadro 3.1) (270).

Embora à chegada os juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima apresentassem menor peso do corpo, do fígado e das brânquias, bem como menores índices hepato e branquio-somáticos do que os efetivos da bacia do Vouga, a aclimação à salinidade levou a que os animais da bacia do Lima apresentassem uma evolução mais favorável do peso do

fígado e brânquias, dos índices hepato e branquio-somáticos, bem como do fator de condição de Fulton, indiciadora de maior sucesso na migração trófica. Esta resposta poderá ter sido previamente determinada por melhores condições ambientais da bacia do Lima e contribuiu para a escolha das bacias do Lima e Vouga para prosseguir este estudo no ensaio II.

3.1.2. Biotransformação

3.1.2.1. Tecido hepático

O sistema citocromo P450 corresponde essencialmente a uma cadeia de transporte de eletrões localizada no retículo endoplasmático onde uma proteína monomérica CPR aceita os equivalentes redutores do coenzima NADPH para os doar a um conjunto multivariado de isoenzimas designados por citocromos P450, os aceitadores finais. Do ponto de vista estrutural, os citocromos P450 são hemotiolato proteínas, nas quais o grupo hemo faz parte do centro ativo (79,309). Deste modo, uma forma indireta de quantificar a quantidade total de citocromos P450 passa pela quantificação do conteúdo em hemo da fração microsomal do tecido em análise, neste caso o tecido hepático.

Assim, o conteúdo em hemo microsomal hepático detetado, neste ensaio, no grupo controlo à chegada de juvenis da bacia do Minho foi superior ao estimado nos animais do mesmo grupo de efetivos das bacias do Lima, Vouga e Mondego que não diferiam entre si ($p < 0,05$) (Figura 3.1A). O conteúdo hemático microsomal dos animais das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego expostos a salinidade 35 não apresentavam diferenças significativas do respetivo controlo de ensaio ($p < 0,05$). Contudo, os animais capturados nas bacias do Vouga e do Mondego do grupo controlo de ensaio de salinidade 35 apresentavam um conteúdo em hemo superior ao controlo à chegada ($p < 0,05$). Esta alteração do conteúdo hemático do fígado de juvenis das bacias do Mondego e do Vouga permite indiciar um aumento do conteúdo em citocromos P450 hepáticos pelo cativo. Os animais da bacia do Minho foram aqueles que apresentaram maior quantidade de hemo microsomal hepático após a aclimação ao ambiente salino. Estes resultados sugerem que os efetivos capturados na bacia do Minho expressavam citocromos P450 em quantidade superior à dos animais das restantes bacias, eventualmente devido ao contacto prévio com xenobióticos no habitat natural, durante o período que antecedeu a sua captura.

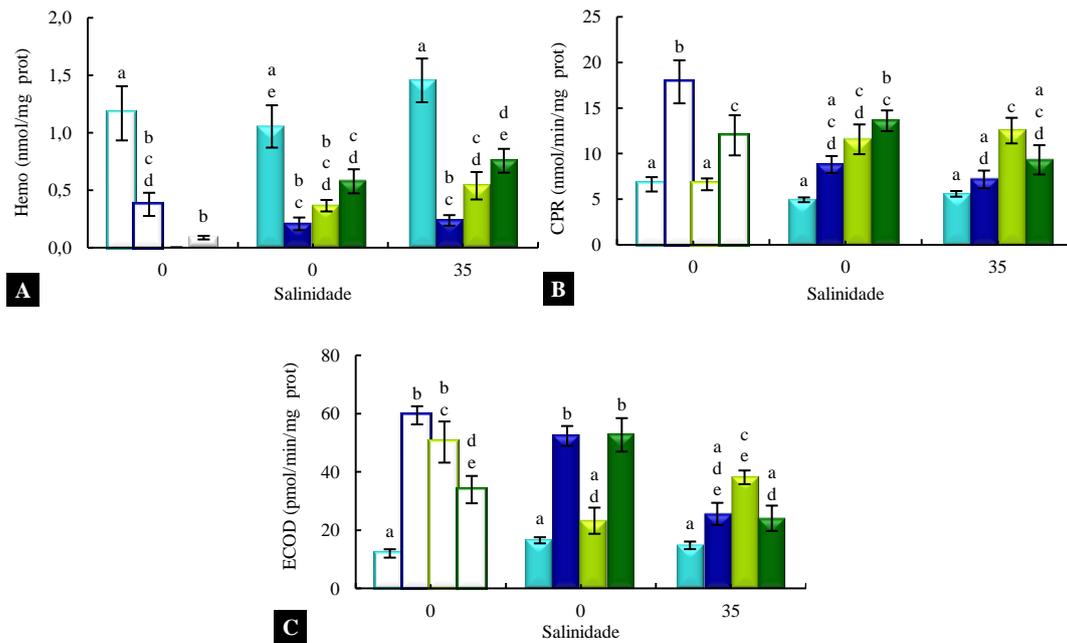


Figura 3.1 - Conteúdo em hemo (A) e atividades enzimáticas CPR (B) e ECOD (C) da fração microsomal hepática de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro) do Ensaio I, no grupo controlo à chegada (barras vazias) e nos grupos de controlo do ensaio e submetidos a uma escala crescente e gradual de salinidade 35, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

Proseguindo com o sistema de biotransformação da Fase I, procurou-se avaliar os níveis de atividade enzimática CPR, o principal enzima envolvido na transferência de equivalentes redutores (79,309). A Figura 3.1B mostra que a atividade enzimática CPR determinada na fração microsomal de tecido hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho, Lima, Vouga e Mondego, era inferior à avaliada na mesma fração hepática em adultos de *Cyprinus carpio* por Solé (2000) (310). A referida figura revela ainda que à chegada, o nível de expressão funcional deste enzima atingiu o valor mais elevado em juvenis da bacia do Lima e mais baixo nos efetivos das bacias do Minho e do Vouga, apresentando valor intermédio nos animais capturados no Mondego. O cativeiro não provocou alterações significativas em macrofthalmias das bacias do Minho e Mondego. No entanto, os efetivos expostos a salinidade 35 e respetivos controlos de ensaio, oriundos das bacias do Vouga e Lima, exibiam níveis de atividade CPR superiores/inferiores ao dos seus grupos controlo à chegada, respetivamente. Esta diferença poderá ser devida, não só à adaptação às condições de cativeiro, mas também a mecanismos de memória molecular associados às condições em que estiveram expostos no seu habitat, no período que antecedeu a captura. Outro aspeto que merece destaque prende-se com o facto de os animais da bacia do Vouga, expostos à salinidade 35, apresentarem um nível de atividade CPR superior à dos animais do Minho e

Lima ($p < 0,05$). Embora a expressão de enzima CPR possa ter sido induzida por xenobióticos presentes no ambiente dulçaquícola da bacia do Vouga, a sua atividade catalítica poderia encontrar-se inibida pelo próprio indutor ou outro contaminante ambiental. No entanto a sua transferência para ambiente controlado em tanque, livre desses contaminantes, poderá ter despoletado um aumento desta atividade enzimática, associado ao elevado conteúdo intracelular do enzima.

A Figura 3.1C representa a atividade enzimática ECOD, referidas como marcadora das famílias CYP1A e CYP1B em diferentes espécies piscícolas (79). Os níveis de atividade ECOD obtidos neste ensaio eram da mesma ordem de grandeza dos encontrados na literatura para espécies piscícolas (54,311). Os juvenis de lampreia-marinha do grupo de controlo à chegada, provenientes das bacias do Lima e do Vouga, possuíam maior atividade ECOD hepática, não diferindo significativamente entre si ($p < 0,05$). Os efetivos da bacia do Mondego formaram um grupo à parte, com níveis intermédios de atividade ECOD hepática, significativamente inferiores aos determinados nos animais das bacias do Lima e Vouga, mas superiores aos encontrados nos efetivos da bacia do Minho que apresentavam os níveis mais baixos. Embora o cativeiro não tenha perturbado a atividade ECOD hepática dos animais das bacias do Minho e do Lima, provocou um decréscimo significativo dessa atividade catalítica nos efetivos do Lima, expostos ao gradiente de salinidade 35. O cativeiro despoletou nos juvenis do Vouga um decréscimo da atividade ECOD hepática, enquanto nos efetivos do Mondego levou a um aumento da referida atividade catalítica. No entanto, a aclimação ao sal repôs os níveis da referida atividade enzimática para valores próximos dos registados à chegada em ambas as bacias ($p < 0,05$). A exposição ao gradiente de salinidade 35 parece ter uniformizado a expressão funcional destes enzimas, uma vez que apenas a atividade ECOD hepática dos juvenis da bacia do Vouga, diferia da determinada nos animais das bacias do Minho e Mondego, não tendo sido observadas diferenças, com significado estatístico, entre a atividade ECOD hepática dos efetivos destas duas bacias e a dos juvenis da bacia do Lima ($p < 0,05$). Como a exposição ao gradiente de salinidade, levou a que os efetivos da bacia do Vouga apresentassem os níveis mais elevados de atividade catalítica, marcadoras das famílias CYP 1A e 1B, pode-se inferir que durante o período que precedeu a sua captura tenham contactado, no seu habitat, com xenobióticos distintos dos que afetaram esta atividade catalítica nos juvenis das outras bacias.

As atividades UDPGT e GST constituem um conjunto lato de enzimas envolvidos na biotransformação de xenobióticos, participando em processos de desintoxicação que

envolvem a conjugação dos xenobióticos ou dos seus derivados com o ácido glicorónico ou com o glutathione, respetivamente (126,312).

Os valores de atividade enzimática UDPGT hepáticos calculados nas frações microsossomais de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho, Lima, Vouga e Mondego encontravam-se, em alguns casos, próximos, e noutros, superiores aos consultados na literatura (310). A atividade UDPGT hepática de localização microsossomal (Figura 3.2A), de macroftalmias das bacias do Minho e do Mondego apresentavam à chegada valores inferiores aos detetados nos animais do Lima mas diferentes entre si ($p < 0,05$). A referida atividade catalítica não foi detetada nos juvenis da bacia do Vouga. Os níveis de atividade UDPGT dos animais da bacia do Minho não foram afetados pelo cativeiro, nem pela aclimação a salinidade 35. No entanto, os juvenis de lampreia-marinha capturados na bacia do Lima apresentavam níveis de atividade UDPGT hepática inferiores aos detetados no grupo controlo à chegada, quer na ausência, quer na presença de sal, não diferindo entre si. Curiosamente, o cativeiro provocou um aumento da atividade UDPGT hepática dos efetivos capturados na bacia do Vouga, quer na ausência quer na presença de sal, sendo significativamente mais elevada nos animais que foram expostos ao gradiente de salinidade. Embora a expressão dos enzimas UDPGT hepáticos possa ter sido induzida por xenobióticos presentes no ambiente dulçaquícola da bacia do Vouga, a sua atividade catalítica poderia encontrar-se inibida pelo próprio indutor ou outro contaminante ambiental. No entanto a sua transferência para o ambiente controlado em tanque, livre desses contaminantes, poderá ter possibilitado a deteção da sua expressão funcional pelo aumento da referida atividade enzimática. Os juvenis do Mondego incluem-se entre o grupo de efetivos que à chegada possuíam nível de atividade UDPGT mais baixo. Todavia a transferência desses animais para ambiente controlado em tanque tornou indetetável esta atividade catalítica, quer na ausência quer na presença de sal, uma alteração inversa à detetada nos animais da bacia do Vouga. Considerando que à chegada a expressão funcional dos enzimas UDPGT hepáticos era fraca, pode-se admitir que o contacto ténue com eventuais indutores não foi suficiente para assegurar níveis detetáveis desta atividade catalítica em cativeiro.

Outro enzima localizado no retículo endoplasmático hepático é a mGST (79), cujo perfil de atividade representado na Figura 3.2B, revela que a referida atividade catalítica era da mesma ordem de grandeza da determinada em embriões da espécie piscícola *Danio rerio* (313). A referida figura mostra que os juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e do Vouga exibiam à chegada os níveis mais elevados de atividade mGST hepática, sendo seguidos pelos efetivos oriundos das bacias do Mondego e do Minho ($p < 0,05$).

Surpreendentemente, os efetivos da bacia do Minho que apresentavam à chegada os níveis mais baixos de atividade mGST, não foram afetados quer pelo cativoiro quer pela aclimação à salinidade ($p < 0,05$). O cativoiro e/ou a aclimação à salinidade 35 dos juvenis das bacias do Lima e do Vouga também não provocaram qualquer perturbação na atividade mGST ($p < 0,05$).

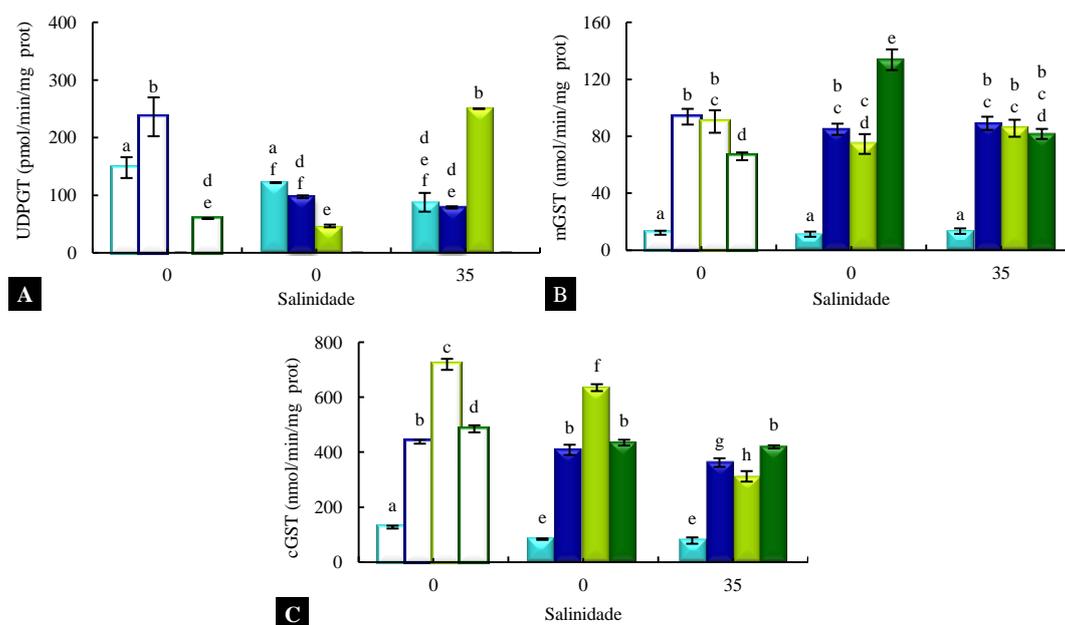


Figura 3.2 - Atividades enzimáticas UDPGT (A) e mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro), do Ensaio I, no grupo controlo à chegada (barras vazias) e nos grupos de controlo do ensaio e submetidos a uma escala crescente e gradual de salinidade 35, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-h) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

Contudo, o cativoiro levou a que os animais oriundos da bacia do Mondego apresentassem níveis de atividade mGST superiores aos detetados em qualquer dos grupos analisados, efeito que parece ter sido atenuado pela aclimação ao sal, para valores idênticos aos dos efetivos provenientes das bacias do Lima e do Vouga. Em qualquer dos grupos analisados, os juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima, Vouga e Mondego exibiam níveis de atividade superiores (~10x) aos detetados nos animais da bacia do Minho. Provavelmente, os juvenis capturados nas outras bacias desenvolveram maior capacidade de desintoxicação microsossomal de xenobióticos, por conjugação com o glutatono, devido a exposição prévia com contaminantes ambientais do seu habitat, no período que antecedeu a sua captura.

As reações de conjugação com o glutathione também podem ocorrer no citoplasma do tecido hepático (cGST), mas catalisadas por proteínas heterodiméricas estruturalmente distintas das que catalisam a atividade mGST que são homotrímeros (79). A Figura 3.2C revela o perfil de atividade cGST detetado nos animais provenientes das 4 bacias analisadas neste ensaio, mostrando valores de atividade enzimática superiores aos obtidos por Vieira (2014) em *Astyanax altiparanae* (194). À semelhança do que foi detetado para a mGST, os animais oriundos da bacia do Minho apresentavam à chegada os níveis mais baixos de atividade cGST hepática ($p < 0,05$). Por outro lado, foram os animais da bacia do Vouga aqueles que apresentaram à chegada os valores mais elevados desta atividade catalítica, possuindo as macroftalmias das bacias do Lima e do Mondego, valores intermédios de atividade cGST, mas significativamente diferentes entre si. O cativo conservou o perfil de atividade cGST dos *transformers* das quatro bacias, próximo do detetado à chegada, mas provocou um decréscimo da referida atividade enzimática nos efetivos da bacia do Minho, Vouga e Mondego. A aclimação ao sal acentuou o decréscimo da atividade cGST hepática dos juvenis das bacias do Lima e Vouga e manteve em baixa a referida atividade catalítica nos efetivos do Mondego. À semelhança do que foi descrito para os isoenzimas mGST, os animais capturados nas bacias do Lima Vouga e Mondego possuíam atividade cGST muito superior às dos juvenis da bacia do Minho que foi afetada pelo cativo mas não se alterou pela exposição ao gradiente de salinidade 35. Provavelmente, os níveis mais elevados de atividade cGST detetados nos efetivos do Lima, Vouga e Mondego foram determinados pela presença de contaminantes comuns nas referidas três bacias que não estavam presentes na bacia do Minho (Figura 3.2C).

Apesar de a exposição ao gradiente de salinidade 35 ter provocado um decréscimo da atividade cGST hepática em todos os juvenis de lampreia-marinha analisados neste ensaio, a indução pré-cativo foi menos influente nos juvenis da bacia do Minho. Assim, é admissível que as diferenças de expressão funcional aqui descritas resultem de mecanismos de indução distintos.

3.1.2.2. Tecido branquial

Os enzimas da Fase II da biotransformação, como UDPGT e GST com localização branquial, são usualmente descritos na literatura como biomarcadores de contacto e/ou de risco de espécies piscícolas com xenobióticos. Deste modo, inicia-se a leitura dos resultados

relativos aos enzimas do retículo endoplasmático envolvidos na conjugação de xenobióticos e/ou dos seus derivados com o ácido glicorónico ou com o tripéptido glutationo (119).

A Figura 3.3A traça o perfil de resposta do enzima UDPGT branquial nas 4 bacias analisadas neste ensaio, representando valores superiores aos encontrados na literatura para espécies piscícolas (310). A Figura 3.3A revela também que os juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho e do Mondego apresentavam à chegada idêntica atividade UDPGT branquial, mas inferior às dos efetivos das bacias do Lima e do Vouga, apresentando os animais da bacia do Vouga os níveis mais elevados da referida atividade catalítica ($p < 0,05$). Convém ainda destacar que os níveis de atividade catalítica UDPGT branquial foram sempre superiores aos detetados no tecido hepático dos animais de cada bacia, sendo a maior diferença registada nos animais capturados nas bacias do Vouga e do Mondego, algo expectável, tendo em conta a maior vulnerabilidade das brânquias como porta de contacto com contaminantes ambientais ($p < 0,05$). A Figura 3.3A permite ainda observar que o cativeiro e a aclimação ao sal não afetaram a atividade catalítica UDPGT branquial dos efetivos da bacia do Minho ($p < 0,05$). Por outro lado, a referida figura mostra também que atividade UDPGT branquial dos efetivos da bacia do Lima aumentou com exposição ao gradiente de salinidade 35, para níveis idênticos aos do grupo controlo à chegada. O cativeiro provocou um decréscimo da atividade UDPGT branquial dos juvenis de lampreia-marinha pertencentes ao controlo de ensaio de salinidade 35, oriundos da bacia do Vouga que atingiu valores próximos dos determinados no tecido branquial dos efetivos das bacias do Minho e do Mondego.

A elevada atividade UDPGT branquial que os animais da bacia do Vouga apresentavam à chegada, sugere a sua indução por fatores ambientais da bacia. Contudo, a reversão do efeito em cativeiro, quer na ausência quer na presença de sal, poderá justificar-se com a ausência de contacto com o indutor. Por outro lado, o decréscimo da atividade UDPGT detetado nos animais da bacia do Mondego, após exposição ao gradiente de salinidade 35 permite inferir perda de funcionalidade destes enzimas pela exposição ao sal, resposta idêntica à detetada no tecido hepático (Figura 3.2A) onde estes animais exibiram, à chegada, níveis muito baixos de atividade UDPGT que se tornaram indetetáveis após exposição às condições de cativeiro. Esta resposta poderá ter sido influenciada por algum atraso no desenvolvimento destes animais, condicionado ou não por fatores ambientais. De qualquer forma, os juvenis de lampreia-marinha da bacia do Minho poderão ter maior dificuldade em responder a poluentes ambientais por conjugação com o ácido glicorónico após aclimação ao sal e assim ver comprometido o sucesso da sua migração trófica.

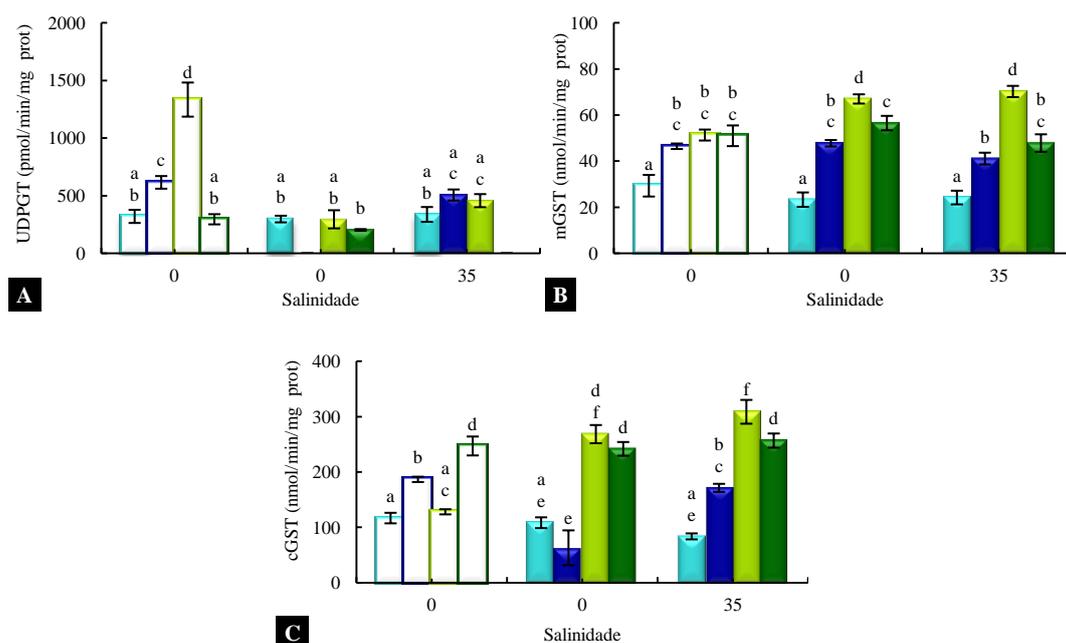


Figura 3.3 - Atividades enzimáticas UDPGT (A) e mGST (B) da fração microsossoma, e cGST (C) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro), do Ensaio I, no grupo controlo à chegada (barras vazias) e nos grupos de controlo do ensaio e submetidos a uma escala crescente e gradual de salinidade 35, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-f) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

No que diz respeito às reações de conjugação com o glutatono do retículo endoplasmático (mGST) (79), a Figura 3.3B mostra que a atividade enzimática mGST branquial assumiu valores na mesma ordem de grandeza e superiores aos determinados por Andrade (2016), para embriões da espécie piscícola *Danio rerio* (313). A referida figura revela também que os juvenis provenientes da bacia do Minho foram aqueles que exibiram menor atividade catalítica mGST branquial, não tendo sido detetadas diferenças significativas entre os grupos controlo à chegada dos efetivos das restantes bacias. O cativo e/ou a exposição ao gradiente de salinidade 35 não provocaram alterações significativas da referida atividade catalítica nos efetivos de quase todas as bacias analisadas neste ensaio. Apenas os juvenis de lampreia-marinha pertencentes ao grupo controlo de ensaio de salinidade 35 e expostos a salinidade 35, capturados na bacia do Vouga, apresentaram um aumento significativo da atividade mGST branquial. O perfil de resposta aqui descrito, aponta para a ocorrência de contacto prévio dos animais das bacias do Lima, Vouga e Mondego com agentes químicos comuns no seu habitat que despoletaram a referida atividade catalítica. O cativo, com ou sem exposição ao gradiente de salinidade não perturbou a indução prévia determinante da resposta que acabou de ser aqui descrita, nos juvenis da maior parte das

bacias analisadas neste ensaio, exceto nos juvenis da bacia do Vouga onde ocorreu um aumento da atividade mGST. Convém ainda referir que a atividade mGST do tecido branquial foi, na maior parte dos casos, da mesma ordem de grandeza das detetadas no tecido hepático, com exceção dos animais capturados na bacia do Minho onde a essa atividade catalítica mostrou-se sempre superior à do tecido hepático (Figura 3.2B).

A Figura 3.3C representa o perfil de atividade enzimática glutationo *S*-transferase citoplasmática (cGST) de juvenis de lampreia-marinha pertencentes às quatro bacias analisadas neste estudo. Na referida figura pode observar-se que os animais do grupo à chegada possuíam valores idênticos aos descritos pela literatura para enguias (*Anguilla anguilla*) (123), espécie migradora que se utilizou para comparação, uma vez que a literatura é omissa quanto ao nível de atividade cGST branquial de juvenis de lampreia-marinha. Os níveis de atividade cGST mais baixos foram detetados em brânquias de juvenis pertencentes ao grupo controlo à chegada, das bacias do Minho e do Vouga que foram superados pelos determinados em macroftalmias das bacias do Lima e do Mondego, apresentando os efetivos da última bacia os níveis de atividade mais elevados ($p < 0,05$) (Figura 3.3C). O cativeiro e/ou o gradiente de salinidade não perturbaram a atividade cGST branquial de juvenis oriundos das bacias do Minho e Mondego. Apesar do cativeiro ter provocado um decréscimo significativo desta atividade catalítica nos juvenis da bacia do Lima, a exposição a esse gradiente de salinidade, repôs a atividade cGST para níveis idênticos aos do controlo à chegada ($p < 0,05$). Curiosamente, o cativeiro provocou um aumento significativo da atividade cGST dos animais oriundos da bacia do Vouga (Figura 3.3C). Contudo, não foram detetadas diferenças significativas entre os juvenis de lampreia-marinha do Vouga, expostos ao gradiente de salinidade 35 e o respetivo controlo de ensaio. A indução da expressão destes enzimas, determinada pelo contacto prévio dos juvenis das bacias do Vouga e do Mondego e, em menor extensão do Lima, com contaminantes do ambiente dulçaquícola onde foram capturados, poderá ter despoletado um aumento da atividade cGST que permaneceu elevada após a exposição ao gradiente de salinidade 35, uma marca distinta da detetada em *transformers* oriundos da bacia do Minho que sempre exibiram atividade cGST mais baixa.

Este mecanismo de memória molecular, para além de constituir um marcador de exposição, permite inferir uma maior ativação das vias de conjugação de xenobióticos com o glutationo, em juvenis de lampreia-marinha onde foi detetada atividade cGST mais elevada. A partir das Figuras 3.2C e 3.3C, pode-se constatar que a atividade cGST branquial era inferior à do tecido hepático nos animais provenientes das bacias do Lima, Vouga e Mondego. Em qualquer dos casos, a atividade cGST branquial e hepática dos juvenis da bacia do Minho foi

sempre muito inferior à detetada em juvenis das outras bacias, apontando para uma menor exposição destes animais a contaminantes aquáticos.

3.1.3. Stress oxidativo e defesas antioxidantes

3.1.3.1. Tecido hepático

Citoplasma

O tripéptido glutationo constitui a principal reserva de enxofre não-proteico dos tecidos animais e é descrito pela literatura como um eficiente antioxidante que contribui para a estabilização do ambiente redutor intracelular (79,314). Os conteúdos em GSH, GSSG e tióis totais não-proteicos (GSH + GSSG) quantificados no tecido hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho, Lima, Vouga e Mondego, eram próximos dos encontrados na literatura para juvenis da espécie piscícola *Leporinus elongatus* descrito por Filho (314) ou de espécies de lagostins (315).

A Figura 3.4A representa o conteúdo hepático do tripéptido glutationo (GSH) quantificado nos efetivos das quatro bacias hidrográficas eleitas para este ensaio. A referida figura revela que os níveis intracelulares de GSH de juvenis de lampreia-marinha do grupo controlo à chegada das bacias do Minho, Lima e Mondego não apresentavam diferenças com significado estatístico. Contudo, os juvenis capturados na bacia do Vouga possuíam níveis hepáticos de GSH significativamente inferiores aos das outras bacias, resultado que aponta para uma mobilização excessiva do tripéptido para conjugação com xenobióticos via GST, na captura de ROS via GPx ou por equilíbrio químico. O cativeiro ou a aclimação ao sal não causaram alterações significativas neste parâmetro, resultados que suportam a hipótese de indução prévia de alguns enzimas da Fase II de biotransformação pelo habitat, no período que antecedeu a captura.

Por outro lado, a Figura 3.4B revela que os juvenis do grupo controlo à chegada possuíam um perfil do conteúdo hepático em GSSG, produto da oxidação do GSH, distinto do descrito na Figura 3.4A, ou seja, os animais provenientes da bacia do Minho, eram aqueles que possuíam níveis de GSSG mais elevados ($p < 0,05$). No entanto, entre os animais das restantes bacias não se detetaram diferenças significativas. O cativeiro apenas induziu aumento do conteúdo em GSSG hepático nos animais oriundos da bacia do Lima ($p < 0,05$), resposta que aponta para um aumento do consumo de GSH pela via antioxidante eventualmente assistida pela indução da síntese e/ou regeneração endógena de GSH. A exposição ao gradiente salinidade 35 só produziu um aumento significativo dos níveis de

GSSG em juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias do Minho e do Mondego, permanecendo estáveis ao sal, os níveis hepáticos de GSSG de juvenis das bacias do Lima e do Vouga. Assim foram os animais da bacia do Minho que chegaram aos tanques e permaneceram em cativeiro com a resposta antioxidante mediada pelo glutatono mais elevada ($p < 0,05$).

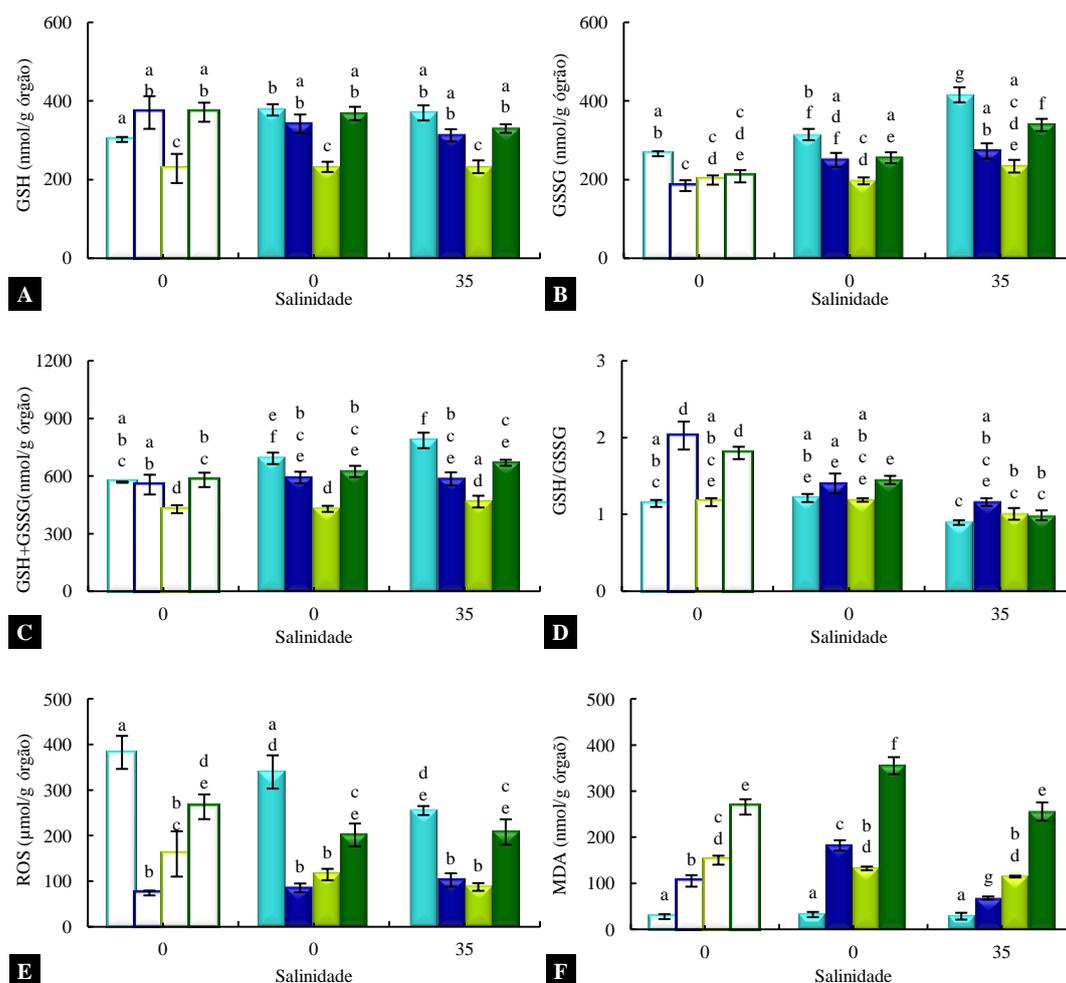


Figura 3.4 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro), do Ensaio I, no grupo controlo à chegada (barras vazias) e nos grupos de controlo do ensaio e submetidos a uma escala crescente e gradual de salinidade 35, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-f) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A partir da Figura 3.4C pode-se observar que o conteúdo hepático em tióis totais não proteicos eram estatisticamente idênticos nos animais do controlo à chegada, capturados nas bacias Minho, Lima e Mondego, apresentando os juvenis do Vouga valores de GSH+GSSG significativamente inferiores aos dos animais das restantes bacias. O cativeiro provocou um aumento significativo das reservas de enxofre não-proteicas do tecido hepático, nos animais

oriundos da bacia do Minho, um fator adicional de proteção antioxidante hepática dos juvenis desta bacia, face à ausência de alterações nos efetivos das restantes bacias ($p < 0,05$). A aclimação ao sal não induziu alterações significativas neste parâmetro nos efetivos de qualquer das bacias estudadas neste ensaio, permanecendo esse conteúdo mais elevado nos animais capturados na bacia do Minho. Por outro lado, os animais do Vouga foram aqueles onde esse parâmetro não foi afetado quer pelo cativo, quer pela aclimação ao sal, mas que manifestaram sempre menor conteúdo em GSH+GSSG. Tal resposta poderá conferir maior debilidade hepática no que diz respeito à proteção antioxidante mediada pelo glutatióno. Deste modo o sucesso da migração tónica dos animais do Vouga poderá ficar comprometido, caso a ocorrência de danos oxidativos comprometam os mecanismos de metabolização de nutrientes pelo fígado.

Quando observamos a Figura 3.4D constatamos surpreendentemente que eram os juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias do Lima e do Mondego do grupo controlo à chegada que possuíam uma razão hepática de GSH/GSSG significativamente superior à dos animais da bacia do Minho e Vouga, entre os quais não se detetaram diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$). O cativo provocou um decréscimo significativo da razão GSH/GSSG nos animais capturados nas bacias do Lima e do Mondego, para níveis próximos dos detetados nos animais oriundos da bacia do Minho e do Vouga. No que diz respeito à aclimação ao sal, apenas os animais da bacia do Minho e do Mondego manifestaram um decréscimo significativo deste parâmetro hepático, grupos onde se observou a maior marca de *stress* oxidativo associada à exposição ao gradiente de salinidade 35. No entanto, os animais das quatro bacias em estudo neste ensaio, não apresentavam diferenças significativas na razão GSH/GSSG, após a aclimação ao sal.

O conteúdo em espécies reativas de oxigénio (ROS), expresso em termos de quantidade de peróxido de hidrogénio citoplasmático, encontram-se representados na Figura 3.4E, correspondendo aos valores superiores aos encontrados na literatura para espécies piscícolas (171,316,317). A referida figura revela ainda que este parâmetro assumiu valores mais elevados no fígado de juvenis de lampreia-marinha do grupo controlo à chegada capturados na bacia do Minho, sendo os animais das bacias do Lima e do Vouga aqueles que apresentavam o menor nível de ROS ($p < 0,05$). O cativo e a aclimação ao sal, não provocou alterações significativas do parâmetro nos animais de qualquer das bacias, permanecendo mais elevado no fígado dos efetivos do Minho e do Mondego ($p < 0,05$).

O conteúdo hepático de malonaldeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lípica, é utilizado com frequência como biomarcador de danos celulares (99). A Figura 3.4F revela que

o conteúdo hepático de MDA estimado em juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho, Lima, Vouga e Mondego eram da mesma ordem de grandeza mas inferiores aos detetados em juvenis de *Leporinus elongatus* (314). A referida figura revela também que os níveis de MDA à chegada hepáticos dos animais da bacia do Minho eram inferiores aos detetados nos efetivos das outras bacias, parâmetro que não foi perturbado quer pelo cativeiro quer pelo contacto com o sal ($p < 0,05$). Por outro lado, os animais provenientes da bacia do Mondego manifestavam maior ocorrência de danos oxidativos, uma vez que à chegada e em qualquer das outras situações o conteúdo em MDA foi sempre significativamente superior ao de qualquer dos grupos analisados neste ensaio, resposta compatível com o elevado nível de ROS descoberto anteriormente ($p < 0,05$). Os juvenis capturados nas bacias do Lima e do Vouga apresentavam níveis intermédios de MDA e conseqüentemente superiores aos dos animais do Minho, exibindo os efetivos do Vouga níveis superiores aos do Lima ($p < 0,05$). O cativeiro despoletou um acréscimo de danos oxidativos nos juvenis do Lima e do Mondego enquanto nos animais da bacia do Vouga não sofreu variações. Apesar da aclimação ao sal conservar o nível de danos oxidativos idêntico ao detetado nos grupos controlo à chegada do Minho, Vouga e Mondego, nos juvenis da bacia do Lima ocorreu com um decréscimo significativo do conteúdo em MDA ($p < 0,05$). Estes resultados permitem inferir que os juvenis capturados nas bacias do Minho e Lima estariam sujeitos a menor pressão ambiental no seu habitat natural, enquanto, que os animais do Vouga e, em particular, do Mondego, apresentavam à chegada maior índice de danos oxidativos no tecido hepático. Provavelmente, os juvenis capturados nas bacias mais a sul, onde é maior a pressão ambiental da indústria química e agrícola viriam a ter pior adaptação à fase parasítica. A confirmar-se o que acabou de ser postulado, o conteúdo em MDA do citoplasma hepático poderá vir a ser um bom indicador da qualidade do ambiente dulçaquícola de lampreia-marinha.

A Figura 3.5 exhibe quatro representações gráficas que permitem avaliar a resposta antioxidante enzimática mediada pelo ciclo de oxidação-redução do glutatono, pela via das pentoses fosfato e pela catalase citoplasmática do tecido hepático de macroftalmias. A consulta bibliográfica revelou que as atividades enzimáticas GR e GPx citoplasmáticas do tecido hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego eram inferiores às publicadas para a fração pós-mitocondrial de *Wallago attu* (32), sendo a atividade enzimática GPx mais próxima desses valores. As Figuras 3.5A e B revelam que as atividades enzimáticas envolvidas no ciclo de oxidação-redução do glutatono, nomeadamente GR e GPx hepáticas, dos grupos controlo à chegada, não exibiam diferenças com significado estatístico entre si, com exceção da atividade GPx do par de juvenis de

lampreia-marinha Mondego/Lima. Deste modo torna-se razoável assumir que uma eventual pressão ambiental do habitat sobre o conteúdo em GSH, GSSG, tióis totais não proteicos e razão GSH/GSSG discutida a propósito da Figura 3.4A-D, poderão ser maioritariamente devidas à resposta antioxidante do tripéptido hepático por equilíbrio redox, sem envolvimento direto destas atividades catalíticas.

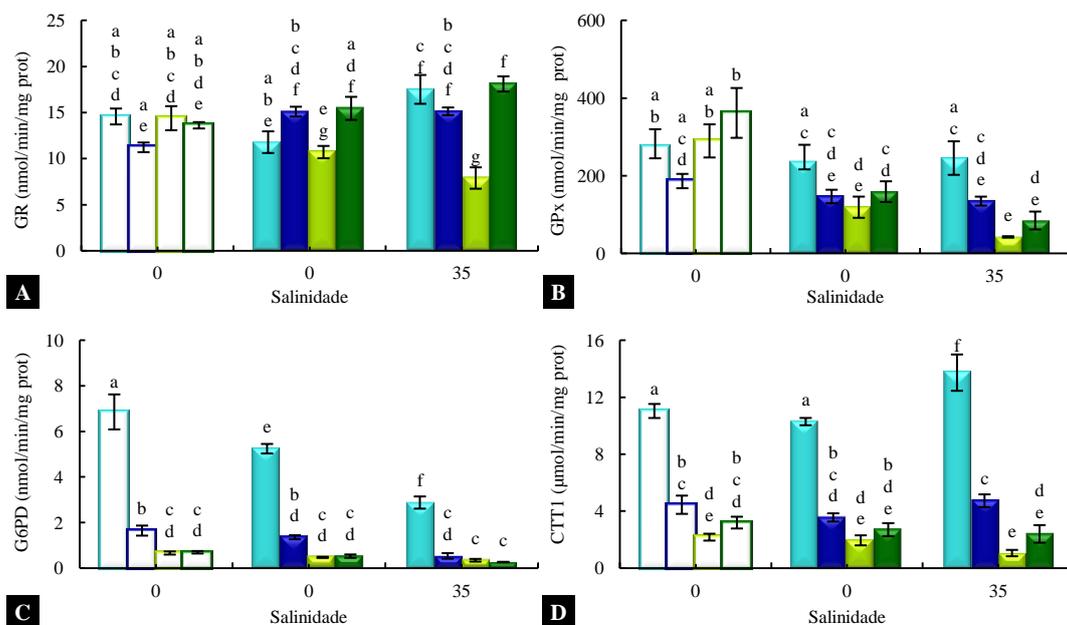


Figura 3.5 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C) e CTT1 (D) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro), do Ensaio I, no grupo controlo à chegada (barras vazias) e nos grupos de controlo do ensaio e submetidos a uma escala crescente e gradual de salinidade 35, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-f) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

O cativoiro provocou um aumento da atividade GR hepática dos animais provenientes da bacia do Lima (Figura 3.5A) ($p < 0,05$). Contudo, foi detetado um efeito inverso nos juvenis provenientes da bacia do Vouga. O aumento da capacidade hepática para regenerar o GSH, via GR em cativoiro, poderá ter suprido as necessidades hepáticas de GSH na resposta ao aumento das atividades mGST e cGST, sendo nesse caso de admitir uma contribuição relevante do enzima GR para a estabilização do ambiente redutor citoplasmático. A exposição ao gradiente de salinidade 35 levou a um aumento da atividade GR hepática de juvenis da bacia do Minho, mas não afetou a referida atividade catalítica dos efetivos das bacias do Lima, Vouga e Mondego.

No que diz respeito a outra atividade enzimática do ciclo do glutathione, GPx (Figura 3.5B) as condições de cativoiro também não afetaram esta atividade catalítica nos

animais oriundos das bacias do Minho e Lima. Contudo, observou-se um decréscimo da atividade GPx nos animais capturados nas bacias do Vouga e Mondego, para valores idênticos aos detetados em *transformers* capturados na bacia do Lima, mas inferiores aos apresentados pelos animais do Minho. Admitindo que a atividade GPx poderá ser um bom indicador de contacto com xenobióticos, pode-se considerar que esses ou outros fatores abióticos presentes nos locais de captura das bacias do Vouga e Mondego não estavam presentes nas condições de cativeiro, deixando assim de se manifestar a referida indução enzimática.

A atividade G6PD, um enzima chave da via das pentoses fosfato, disponibiliza os equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao adequado funcionamento do ciclo do GSH (99). A Figura 3.5C permite constatar que o nível de atividade enzimática G6PD de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho, Lima, Vouga e Mondego era inferior ao determinado na fração pós-mitocondrial do tecido hepático de juvenis de *Oreochromis niloticus* (33). A referida figura permite ainda observar que os juvenis do grupo controlo à chegada, capturados na bacia do Minho exibiam os níveis de atividade G6PD hepática mais elevados das quatro bacias analisadas, muito acima dos detetados nos animais do Lima, Vouga e Mondego, onde os efetivos das duas últimas bacias, correspondem aos animais com menor atividade G6PD hepática ($p < 0,05$). As condições de cativeiro sem ou com exposição ao gradiente de salinidade 35, apenas afetaram a atividade G6PD dos animais oriundos da bacia do Minho, atingindo valores muito inferiores aos detetados em juvenis do controlo à chegada, tendo sido registado o menor valor de atividade G6PD em macroftalmias expostas ao gradiente de salinidade 35 ($p < 0,05$). O nível muito baixo de atividade G6PD dos efetivos das bacias do Lima, Vouga e Mondego, poderão ter contribuído para atenuar o ciclo de oxidação-redução do glutathione, em particular quando o consumo do tripéptido, por reações de conjugação mediadas por glutathione *S*-transferases, permanece elevado.

A atividade CTT1 desempenha um papel fulcral na desintoxicação de peróxidos que se formam em diferentes processos biológicos (99,202). A Figura 3.5D permite observar que essa atividade catalítica hepática de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho, Lima, Vouga e Mondego, apresenta valores inferiores aos encontrados na literatura para as espécies *A. altiparanae* e *C. auratu* (194,318). A referida figura, à chegada, revela também que esse mecanismo de defesa antioxidante era mais evidente nos juvenis de lampreia-marinha capturados na bacia do Minho, sendo mais fraco nos juvenis na bacia do Vouga ($p < 0,05$). Curiosamente, apenas a atividade CTT1 hepática de macroftalmias do Minho aumentou nos animais expostos ao gradiente de salinidade 35. Esta alteração poderia facilitar uma melhor adaptação destes animais ao ambiente salino, uma vez que parece compensar a atividade GPx,

modulada negativamente pela perda de equivalentes redutores sob a forma de NADPH, disponibilizados pelo enzima G6PD.

3.1.3.2. Tecido branquial

Citoplasma

O tecido branquial corresponde àquele que maior contacto estabelece com constituintes abióticos ambientais, e por esse motivo, alguns autores afirmam que poderá ser o que sofrerá mais estímulos indutores de *stress* oxidativo capazes também de despoletar respostas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (79,314).

Os conteúdos em GSH, GSSG e tióis totais não-proteicos do tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego do grupo controlo à chegada, eram semelhantes e próximos dos descritos na literatura para juvenis da espécie piscícola *Leporinus elongatus* (314), ou de lagostins (315) (Figura 3.6A-C).

O cativoiro, não afetou o conteúdo intracelular do tripéptido GSH nos animais das bacias do Minho e do Lima, resposta distinta da detetada nos efetivos do Vouga e do Mondego onde aumentou (Figura 3.6A) ($p < 0,05$). Apesar do gradiente de salinidade 35 não ter afetado o nível citoplasmático branquial do tripéptido dos efetivos do Vouga e do Mondego, os animais capturados na bacia do Lima manifestaram um decréscimo significativo desse parâmetro comparativamente com o respetivo controlo de ensaio, mas permanecendo idêntico ao grupo controlo à chegada. O nível elevado de GSH branquial dos juvenis da bacia do Minho poderá ser justificado, em parte, pela boa capacidade do tecido para regenerar o GSH, sem aumento significativo do seu consumo pelas atividades de biotransformação mGST e cGST.

A partir da Figura 3.6B pode-se constatar que o conteúdo em GSSG dos grupos controlo à chegada não apresentavam diferenças com significado estatístico entre bacias ($p < 0,05$). Apesar de as condições de cativoiro não terem perturbado os níveis de dissulfureto de glutatióno (GSSG) em juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima, Vouga e Mondego, observou-se um acréscimo significativo deste conteúdo nos indivíduos pertencentes ao grupo controlo de ensaio da bacia do Minho. A exposição ao gradiente salinidade causou um acréscimo significativo deste conteúdo nos animais da bacia do Minho, não afetando o conteúdo em GSSG dos indivíduos das restantes bacias ($p < 0,05$). Estes resultados permitem inferir que as condições de cativoiro e em particular o contacto com o sal despoletaram, na bacia do Minho, uma resposta antioxidante mediada por este par redox.

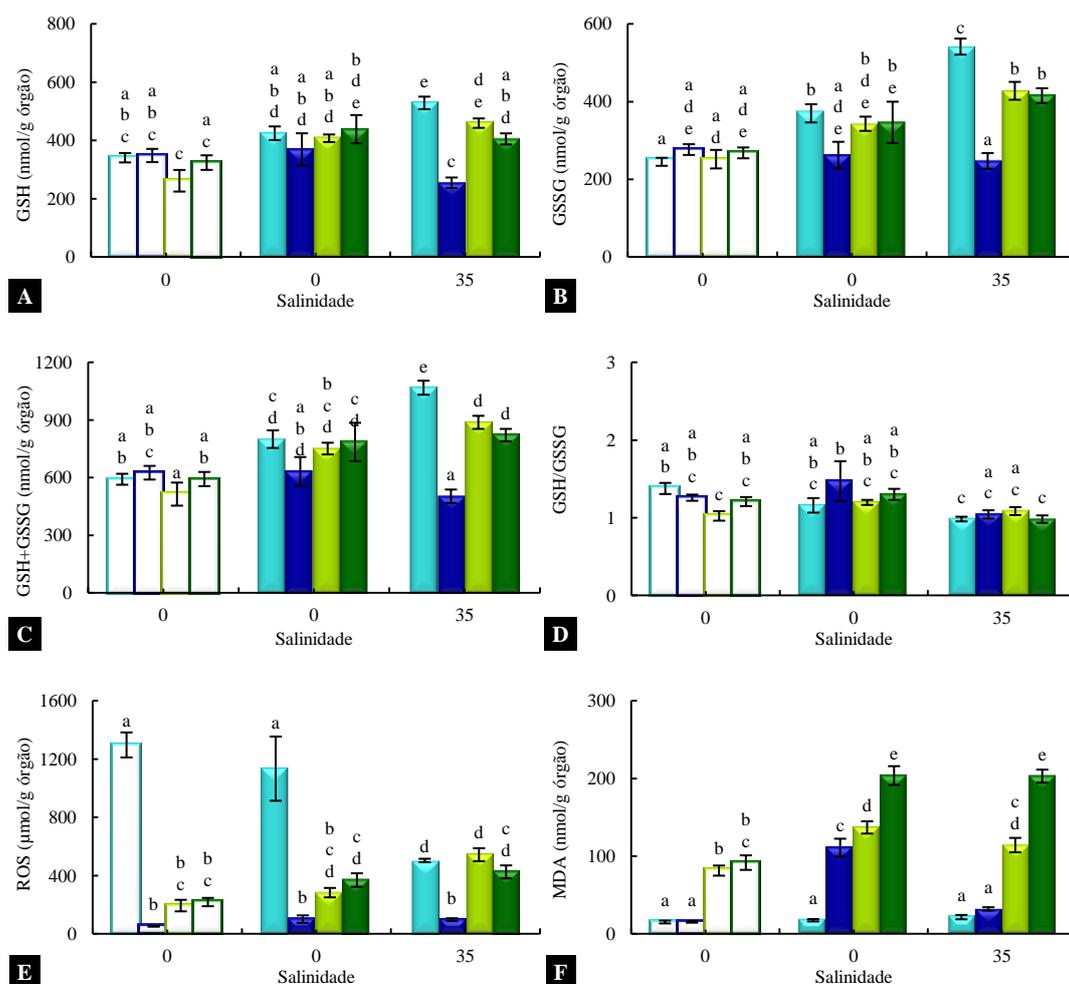


Figura 3.6 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (cor azul claro), Lima (cor azul escuro), Vouga (cor verde claro) e Mondego (cor verde escuro), do Ensaio I, no grupo controlo à chegada (barras vazias) e nos grupos de controlo do ensaio e submetidos a uma escala crescente e gradual de salinidade 35, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A Figura 3.6C mostra que o conteúdo branquial em tióis totais não proteicos era idêntico em todos os grupos controlo à chegada ($p < 0,05$). No entanto, o cativo despoletou um aumento desse conteúdo nos animais das bacias do Minho, Vouga e Mondego ($p < 0,05$). A aclimação ao sal apenas provocou um aumento das reservas de enxofre não proteicas nos efetivos do Minho. De acordo com o descrito nas Figuras 3.4A-C, pode-se inferir que a exposição de juvenis de lampreia-marinha ao gradiente de salinidade 35, despoletou uma resposta distinta da detetada nos animais da bacia do Minho.

A razão GSH/GSSG (Figura 3.6D), determinada nos indivíduos do grupo controlo à chegada, da bacia do Vouga, era inferior à dos juvenis do Minho. O ambiente mais oxidante detetado no citoplasma branquial dos animais do Vouga permite considerar que esses

indivíduos encontravam-se sujeitos a maior *stress* ambiental do que os juvenis do Minho no instante da captura. Contudo, o cativeiro e a aclimação ao sal, não perturbaram o ambiente redutor do citoplasma branquial dos juvenis das bacias do Minho, Vouga e Mondego. Apenas foi detetado um decréscimo significativo da razão GSH/GSSG branquial dos juvenis da bacia do Lima ($p < 0,05$).

Surpreendentemente, o conteúdo em ROS ao determinado nos indivíduos das restantes bacias ($p < 0,05$). Um perfil idêntico desse conteúdo foi observado nos efetivos do grupo controlo de ensaio de salinidade. Contudo, a exposição ao gradiente de salinidade 35, provocou um decréscimo aproximado de 60%, no conteúdo em ROS branquial dos animais da bacia do Minho, que passou a assumir valores próximos dos determinados nos indivíduos das bacias do Vouga e do Mondego. Destacam-se ainda os juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima por terem apresentado o menor conteúdo em ROS das quatro bacias analisadas neste ensaio. Embora este conjunto de resultados volte a ser discutido um pouco mais adiante, a propósito do perfil de atividade enzimática G6PD (Figura 3.7C), o nível elevado de ROS, detetado nos grupos controlo da bacia do Minho, parecem ter sido atenuados pela exposição ao gradiente de salinidade 35, uma vez que os efetivos dessa bacia exibiam conteúdo em ROS idêntico ao detetado nos animais das bacias do Vouga e do Mondego. O aumento do conteúdo em GSH, GSSG e tióis totais não-proteicos poderá ter sido o principal mecanismo compensatório que determinou a queda desses níveis de ROS branquiais ($p < 0,05$).

O conteúdo branquial de MDA (Figura 3.6F), determinado em juvenis de lampreia-marinha das bacias analisadas neste ensaio, era igual ou superior ao detetado em brânquias das espécies piscícolas *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus* (318.1).

Os juvenis das bacias do Minho e do Lima, apresentavam à chegada níveis de MDA estatisticamente inferiores aos detetados em indivíduos do Vouga e Mondego que eram idênticos entre si ($p < 0,05$) (Figura 3.6F). O cativeiro em água doce provocou um aumento significativo do conteúdo em MDA das brânquias dos efetivos das bacias do Lima, Vouga e Mondego. Os animais expostos ao gradiente de salinidade 35 das bacias do Minho, Vouga e Mondego, não apresentavam diferenças significativas relativamente ao seu respetivo controlo de ensaio. Contudo, o nível de MDA diminuiu nos efetivos do Lima para valores idênticos aos do grupo controlo à chegada ($p < 0,05$) (Figura 3.6F). O índice de danos oxidativos mais elevado foi detetado nos efetivos da bacia do Vouga e do Mondego, sendo superior nos efetivos da última bacia do Mondego ($p < 0,05$). No entanto, os juvenis das bacias do Minho e do Lima apresentavam à chegada, conteúdo vestigial em MDA branquial ($p < 0,05$). O menor

índice de peroxidação oxidativa detetado nos juvenis da bacia do Lima, após a aclimação ao sal, sugere um ambiente dulçaquícola mais pristino nesta bacia.

A Figura 3.7A mostra que os indivíduos do controlo à chegada das bacias do Minho e Mondego apresentavam atividade GR branquial significativamente superior à determinada nos indivíduos do Lima e do Vouga, ainda que inferior aos encontrados na literatura (169). O cativeiro não perturbou significativamente esta atividade enzimática das brânquias de juvenis de lampreia-marinha provenientes da bacia do Minho e Lima, tendo no entanto, ocorrido um aumento significativo da atividade GR branquial nos efetivos oriundos da bacia do Vouga e um decréscimo nos indivíduos do Mondego ($p < 0,05$). Todavia, a exposição ao gradiente de salinidade 35, não provocou alterações com significado estatístico da atividade GR dos juvenis das bacias do Minho, Lima e Vouga ($p < 0,05$). No caso dos indivíduos da bacia do Minho, Lima e Mondego até permaneceu estatisticamente idêntica à determinada nos grupos controlo à chegada de cada bacia. Nos juvenis do Mondego, observou-se um aumento desta atividade catalítica, comparativamente com o seu grupo controlo de salinidade 35. Assim, parece que a capacidade regenerativa do GSH branquial foi amplamente melhorada pelas condições do cativeiro, nos animais capturados na bacia do Vouga, facto que sugere uma pior qualidade do ambiente dulçaquícola dessa bacia.

A Figura 3.7B revela que a atividade GPx branquial dos efetivos do controlo à chegada, das bacias do Lima e do Vouga não apresentava diferenças com significado estatístico, mas era superior à detetada nos indivíduos capturados nas bacias do Minho e do Mondego, entre os quais não existiam diferenças significativas ($p < 0,05$). Por outro lado, os valores representados na referida figura eram de ordem de grandeza inferior à descrita na literatura (32). O cativeiro não alterou o perfil de atividade enzimática GPx branquial dos efetivos das quatro bacias analisadas neste ensaio. Contudo, a exposição ao gradiente de salinidade 35 provocou um decréscimo da atividade GR presente nas brânquias de juvenis do Lima e do Vouga, para níveis idênticos aos detetados nos efetivos do Minho e do Mondego, uniformizando a capacidade antioxidante branquial desses animais para eliminar peróxidos e lipoperóxidos.

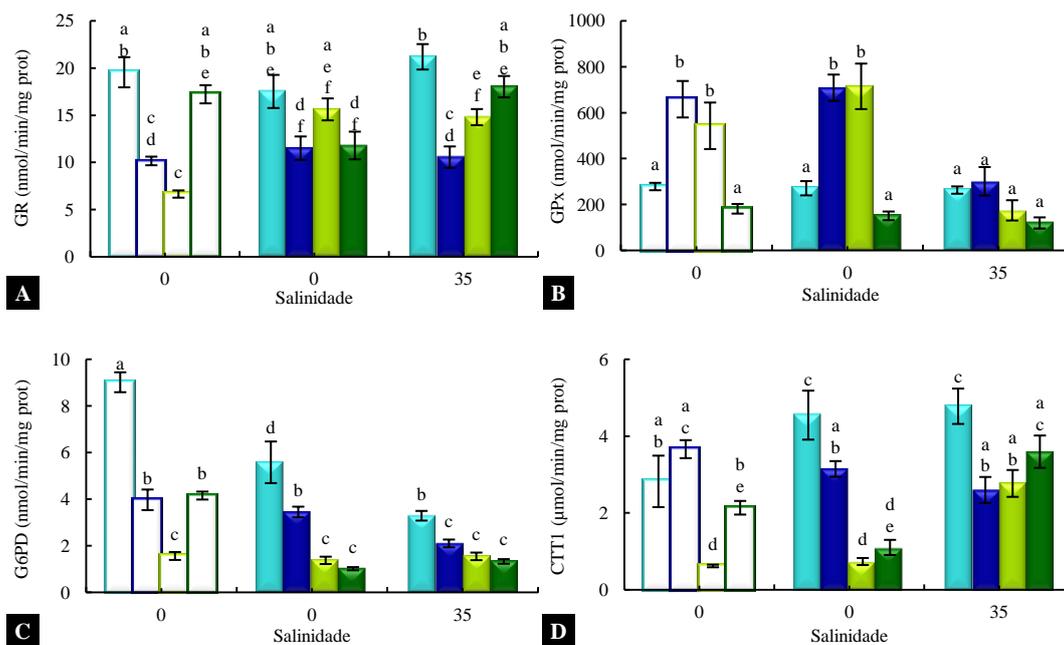


Figura 3.7 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C) e CTT1 (D) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Minho (azul claro), Lima (azul escuro), Vouga (verde claro) e Mondego (verde escuro), do Ensaio I, no grupo controlo à chegada (barras vazias) e nos grupos de controlo do ensaio e submetidos a uma escala crescente e gradual de salinidade 35, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A atividade enzimática G6PD branquial representada graficamente na Figura 3.7C mostrou-se inferior à determinada na fração pós-mitocondrial do tecido branquial de *Wallago attu* (169). A referida atividade catalítica detetada nos grupos controlo à chegada era significativamente mais elevada nos juvenis capturados na bacia do Minho, ocorrendo um mínimo nos efetivos provenientes da bacia do Vouga ($p < 0,05$). O catifeiro provocou um decréscimo significativo da atividade G6PD nos indivíduos das bacias do Minho e do Mondego. Além disso, a exposição ao gradiente de salinidade 35 acentuou essa variação negativa nos efetivos das bacias do Minho e do Lima ($p < 0,05$). Por outro lado, o perfil de atividade G6PD dos indivíduos da bacia do Minho parece sobrepor-se ao seu perfil de conteúdo em ROS branquial discutido a propósito da Figura 3.6E. Os níveis elevados de atividade G6PD detetados nessa bacia, bem como a consequente geração de equivalentes redutores sobre a forma de NADPH, poderão ter contribuído para estabilizar o ambiente redutor das células branquiais, prevenindo a ocorrência de danos oxidativos associados aos níveis de ROS elevados que foram detetados nesses animais. Deste modo, o *stress* salino parece ter exercido um efeito modulador comum nos níveis de ROS e de atividade G6PD que merece ser clarificado em estudos futuros.

A Figura 3.7D revela que os níveis de atividade CTT1 branquial dos indivíduos do controlo à chegada, das bacias do Minho e Lima, não diferiam entre si e eram estatisticamente superiores aos determinados nos juvenis das bacias do Vouga e do Mondego, detetando-se nos indivíduos do Vouga, o menor valor dessa atividade catalítica ($p < 0,05$). Por outro lado, a atividade CTT1 representada na referida figura assumiu valores inferiores aos descritos pela literatura (194,313). O cativeiro levou apenas ao aumento da atividade CTT1 dos juvenis da bacia do Minho. Por outro lado, a exposição ao gradiente de salinidade 35 provocou um aumento da atividade catalase citoplasmática branquial dos juvenis de lampreia-marinha das bacias do Vouga e do Mondego, sem afetar a dos efetivos do Minho e do Lima. Destaca-se ainda que os animais da bacia do Minho, mantidos em gradiente de salinidade, apresentavam atividade CTT1 mais elevada do que os animais do Lima e do Vouga.

3.2. Caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II)

Os resultados apresentados e discutidos neste sub-capítulo (Ensaio II) integram o estudo detalhado da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha oriundos apenas de duas bacias hidrográficas portuguesas, Lima e Vouga, expresso em termos de evolução de parâmetros morfométricos, de conteúdos e de enzimas pertencentes a sistemas de biotransformação e/ou de resposta ao *stress* oxidativo.

Neste ensaio, juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias hidrográficas do Lima e Vouga, foram organizados em sete grupos de tratamentos distintos, conforme previamente descrito no sub-capítulo 2.3. e designados por “controlo à chegada”, “controlo do ensaio salinidade 10”, “exposto à salinidade 10”, “controlo do ensaio salinidade 25”, “exposto à salinidade 25”, “controlo do ensaio salinidade 35”, “exposto à salinidade 35”.

À semelhança do que foi descrito no Ensaio I, a caracterização morfométrica aqui descrita inclui parâmetros como o comprimento total (TL), peso corporal (TW), peso do fígado (LW), peso das brânquias (GW), índice hepato-somático (HSI), índice branquio-somático (GLSI), e o fator de condição de Fulton (K).

A caracterização bioquímica engloba o conteúdo em hemo, atividades enzimáticas ALP, CPR e ECOD microsossomais hepáticas, atividades enzimáticas mGST e UDPGT microsossomais hepáticas e branquiais e as atividades enzimáticas cGST citoplasmáticas hepáticas e branquiais que participam em processos de biotransformação. Ainda são descritos e discutidos marcadores de *stress* oxidativo hepáticos e branquiais como os conteúdos em

GSH, GSSG, GSH+GSSG, a razão GSH/GSSG, ROS e MDA, bem como as atividades enzimáticas GR, GPx, G6PD, SOD1 e CTT1.

3.2.1. Biometria

O Quadro 3.2 revela que o comprimento dos juvenis de lampreia-marinha pertencentes aos grupos controlo à chegada, controlo do ensaio e expostos ao sal das bacias do Lima e do Vouga não apresentava, na maior parte dos casos, diferenças com significado estatístico, assumindo valores que variavam entre 140 e 152 mm, da mesma ordem de grandeza dos descritos pela literatura (1-4). Apenas foram detetadas diferenças significativas, entre os animais expostos a salinidade 10 ou 35 da bacia do Vouga e os animais da bacia do Lima expostos a salinidade 10 ou 35 e controlo do ensaio de salinidade 25 ou 35. O comprimento dos animais determinados neste ensaio era idêntico aos registados nos juvenis de lampreia-marinha capturados em 2010 em ambas as bacias e que foram utilizados no Ensaio I (Quadro 3,1).

Quadro 3.2 – Parâmetros morfométricos de juvenis de lampreia-marinha das bacias hidrográficas do Lima e Vouga do Ensaio II no grupo controlo à chegada (Grupo 1), controlo do ensaio salinidade 10 (Grupo 2), exposto à salinidade 10 (Grupo 3), controlo do ensaio salinidade 25 (Grupo 4), exposto à salinidade 25 (Grupo 5), controlo do ensaio salinidade (Grupo 6), exposto à salinidade 35 (Grupo 7). Os resultados representam a média de 40 animais em cada grupo \pm erro padrão da média. As médias de uma mesma coluna assinaladas com letras diferentes (a-d) são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

Bacia	Grupo	S	TL (mm)	TW (g)	LW (g)	HSI (%)	GW (g)	GLSI (%)	K
Lima	1	0	144 \pm 1,5 ^{ab}	4,87 \pm 0,16 ^{abc}	0,0363 \pm 0,0014 ^{ab}	0,75 \pm 0,02 ^{abc}	0,0710 \pm 0,0034 ^{abc}	1,50 \pm 0,08 ^{ab}	0,32 \pm 0,01 ^{ab}
	2	0	147 \pm 1,4 ^{abc}	4,63 \pm 0,13 ^{acd}	0,0376 \pm 0,0011 ^{ab}	0,82 \pm 0,02 ^{ad}	0,0696 \pm 0,0032 ^{ab}	1,51 \pm 0,06 ^{ab}	0,28 \pm 0,00 ^{cd}
	3	10	144 \pm 1,5 ^{ab}	5,05 \pm 0,18 ^{abe}	0,0368 \pm 0,0016 ^{ab}	0,73 \pm 0,02 ^{bc}	0,0840 \pm 0,0058 ^c	1,63 \pm 0,07 ^a	0,33 \pm 0,00 ^b
	4	0	140 \pm 1,5 ^{ab}	5,06 \pm 0,18 ^{abe}	0,0359 \pm 0,0017 ^{ab}	0,75 \pm 0,04 ^{abc}	0,0790 \pm 0,0038 ^{ac}	1,64 \pm 0,10 ^a	0,35 \pm 0,00 ^e
	5	25	148 \pm 3,6 ^{abc}	5,05 \pm 0,18 ^{abe}	0,0394 \pm 0,0018 ^b	0,77 \pm 0,01 ^{abd}	0,0738 \pm 0,0036 ^{abc}	1,46 \pm 0,05 ^{ab}	0,31 \pm 0,01 ^{abc}
	6	0	143 \pm 1,3 ^a	4,39 \pm 0,11 ^d	0,0338 \pm 0,0011 ^a	0,77 \pm 0,02 ^{abd}	0,0681 \pm 0,0027 ^{ab}	1,56 \pm 0,06 ^{ab}	0,29 \pm 0,00 ^{acd}
	7	35	143 \pm 1,4 ^a	4,49 \pm 0,12 ^{cd}	0,0341 \pm 0,0012 ^a	0,76 \pm 0,01 ^{abcd}	0,0609 \pm 0,0036 ^b	1,34 \pm 0,06 ^b	0,30 \pm 0,00 ^{abcd}
Vouga	1	0	148 \pm 2,1 ^{abc}	5,21 \pm 0,14 ^{bc}	0,0355 \pm 0,0013 ^{ab}	0,69 \pm 0,02 ^c	0,1004 \pm 0,0055 ^d	2,00 \pm 0,12 ^c	0,32 \pm 0,02 ^{ab}
	2	0	148 \pm 1,8 ^{abc}	5,23 \pm 0,18 ^{bc}	0,0375 \pm 0,0014 ^{ab}	0,72 \pm 0,02 ^{bc}	0,0793 \pm 0,0045 ^{ac}	1,51 \pm 0,07 ^{ab}	0,30 \pm 0,01 ^{abcd}
	3	10	152 \pm 1,7 ^c	5,30 \pm 0,15 ^{bc}	0,0372 \pm 0,0016 ^{ab}	0,70 \pm 0,02 ^c	0,0739 \pm 0,0030 ^{abc}	1,41 \pm 0,05 ^{ab}	0,29 \pm 0,00 ^d
	4	0	147 \pm 1,6 ^{abc}	5,09 \pm 0,16 ^{abe}	0,0384 \pm 0,0019 ^{ab}	0,76 \pm 0,03 ^{abcd}	0,0798 \pm 0,0039 ^{ac}	1,57 \pm 0,06 ^{ab}	0,30 \pm 0,01 ^{abc}
	5	25	147 \pm 1,3 ^{abc}	5,18 \pm 0,16 ^c	0,0389 \pm 0,0020 ^{ab}	0,75 \pm 0,03 ^{abc}	0,0703 \pm 0,0035 ^{ab}	1,38 \pm 0,07 ^b	0,30 \pm 0,01 ^{abcd}
	6	0	150 \pm 2,0 ^{bc}	5,52 \pm 0,20 ^e	0,0441 \pm 0,0017 ^c	0,81 \pm 0,02 ^{ad}	0,1116 \pm 0,0055 ^d	2,04 \pm 0,08 ^c	0,31 \pm 0,01 ^{abc}
	7	35	152 \pm 1,5 ^c	5,43 \pm 0,14 ^c	0,0450 \pm 0,0015 ^c	0,83 \pm 0,02 ^d	0,0775 \pm 0,0033 ^{ac}	1,42 \pm 0,04 ^{ab}	0,30 \pm 0,00 ^{acd}

Salinidade (S), Comprimento corporal (TL), peso corporal (TW), peso do fígado (LW), índice hepato-somático (HSI), peso das brânquias (GW), índice branquio-somático (GLSI) e fator de condição de Fulton (K).

O Quadro 3.2 permite também observar que o peso corporal de juvenis de lampreia-marinha (4,39 - 5,43 g) das bacias do Lima e Vouga era próximo da ordem de grandeza descrita pela literatura ($p < 0,05$) (1-4). Por outro lado, revela ainda que o peso corporal dos animais da bacia do Lima e do Vouga não foi afetado significativamente pela exposição a

salinidade 10, 25 e 35 ($p < 0,05$). Apesar dos animais da bacia do Lima exibirem, na maior parte dos casos, peso corporal, idêntico ao determinado nos efetivos da bacia do Vouga, os juvenis da bacia do Lima pertencentes aos grupos expostos a salinidade 35 e respetivo controlo do ensaio apresentavam peso corporal inferior ao dos animais da bacia do Vouga ($p < 0,05$). A referida perda de peso corporal poderá ter resultado de menor acumulação de nutrientes na fase larvar, enquanto filtradores, ou a terem sido capturados numa fase mais tardia da metamorfose (23), uma vez que no Ensaio I não foi detetado um perfil idêntico de resposta quer ao cativeiro quer ao gradiente de salinidade 35 (Quadro 3.1).

O peso do fígado de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga pertencentes aos grupos gradiente de salinidade 35 e respetivo controlo do ensaio, apresentava valores superiores aos registados para outros animais da mesma bacia ou da bacia do Lima, facto que leva a inferir aumento da proliferação hepática com o aumento da salinidade. Na literatura encontram-se descritos valores para o peso do fígado de juvenis de lampreia-marinha da mesma ordem de grandeza dos determinados neste ensaio (0,03-0,05 g) (Quadro 3.2) (15,258), assim como para outros animais marinhos como a *Cyprinus carpio* (266) ou a *Tilapia mossambica* (255).

O peso do fígado dos juvenis capturados em 2010 (Ensaio I) na bacia do Lima, do grupo controlo à chegada era inferior ao que foi determinado nesse grupo em 2011 (Ensaio II). A exposição ao gradiente salinidade 35 provocou um aumento do peso do órgão para valores próximos dos anotados em 2011 (Ensaio II). Porém, em 2011, a exposição ao gradiente de salinidade 35 não afetou estatisticamente o peso do fígado dos animais da bacia do Lima. Provavelmente, os efetivos capturados em 2010 encontrar-se-iam numa fase da metamorfose um pouco mais atrasada, uma vez que a captura foi precoce devido a maior pluviosidade no mês de outubro de 2010 que antecipou o início da migração trófica.

Por outro lado, o perfil do peso do fígado dos juvenis da bacia do Vouga de 2010 (Ensaio I) foi diferente do detetado neste ensaio. Em 2010, o peso do fígado dos juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga diminuiu significativamente nos animais expostos a salinidade 35. Contudo, em 2011 deu-se um aumento desse parâmetro biométrico nos grupos exposto a salinidade 35 e respetivo controlo de ensaio, efeito que não parece ser devido à exposição ao gradiente de salinidade como já foi previamente discutido.

O índice hepato-somático (HSI) calculado para os juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias do Lima e Vouga (0,69 – 0,83) (Quadro 3.2) são da mesma ordem de grandeza dos que se encontram descritos na literatura (15,255,258,266).

O referido quadro também permite constatar que o HSI dos animais oriundos das bacias do Lima e do Vouga e expostos a salinidade 10, 25 e 35, não diferia dos respetivos controlos, com exceção do par controlo do ensaio salinidade 10/exposto a salinidade 10 dos efetivos da bacia do Lima onde se observou um decréscimo do HSI. Surpreendentemente, o parâmetro HSI dos animais do Vouga, expostos ou não ao gradiente de salinidade 35, aumentou com o cativoiro.

O índice hepato-somático dos juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, capturados em 2010 e expostos ao gradiente de salinidade 35 era significativamente superior ao calculado para os animais controlo do ensaio e ambos significativamente superiores aos do grupo controlo à chegada, um perfil diferente do observado no Quadro 3.2 para os efetivos capturados em 2011. Contudo, o índice hepato-somático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga, capturados em 2010, expostos ao mesmo gradiente de salinidade era inferior aos determinados para os grupos controlo à chegada e controlo do ensaio, perfil de resposta diferente do registado em 2011 no Ensaio II. A ocorrência de elevada pluviosidade no início de Outubro de 2010, na bacia do Lima, descrita no capítulo Metodologia (262), poderá ter contribuído para o precoce início de migração trófica, com antecipação do período de captura.

O peso das brânquias (0,0609 e 0,1116 g) era inferior ao descrito na literatura para o teleósteo *Oreochromis niloticus* adulto (307) (Quadro 3.2). O referido quadro revela ainda que o peso das brânquias dos efetivos da bacia do Lima, expostos até salinidade 10 mostrou-se significativamente superior ao registado para o respetivo controlo de ensaio. Como os restantes grupos de animais da bacia do Lima, não exibiram diferenças significativas entre si, o aumento do peso do referido órgão, devido à exposição dos animais a salinidade 10, poderá corresponder a uma alteração adaptativa pontual ao sal que se dissipou ao longo do gradiente de salinidade.

O peso das brânquias dos efetivos da bacia do Vouga, pertencentes aos grupos controlo à chegada e controlo do ensaio para salinidade 35 era significativamente superior aos determinados nos restantes grupos de animais (Quadro 3.2). Assim, o cativoiro afetou negativamente o peso branquial dos efetivos do Vouga que no caso da exposição a salinidade 10 e 25 assumiram valores próximos dos detetados em animais da bacia do Lima. Como os juvenis da bacia do Vouga expostos a salinidade 35 exibiam peso branquial significativamente inferior ao respetivo controlo de ensaio, admite-se que a exposição a salinidade 35 exerceu um efeito normalizador na dimensão do órgão ($p < 0,05$).

Neste ensaio não se detetaram diferenças significativas entre o peso das brânquias dos juvenis oriundos da bacia do Lima, expostos a salinidade 35 e o seu controlo de ensaio ou

controlo à chegada, resposta distinta da que foi observada no Ensaio I (2010) onde o peso branquial aumentou com o cativo e/ou com a exposição a salinidade 35 (Quadro 3.1). Esta diferença poderá ser devida a alterações ambientais na bacia do Lima onde em 2010 ocorreu pluviosidade elevada, no curto espaço de tempo que antecedeu a captura dos animais, condições que poderão ter despoletado precocemente a fase de migração trófica. Por outro lado, neste ensaio, os animais da bacia do Vouga sujeitos a salinidade 35 apresentavam peso das brânquias inferior ao determinado no respetivo controlo de ensaio, um perfil semelhante ao detetado em 2010 (Ensaio I). Todavia em 2011 não foram detetadas diferenças significativas entre o controlo do ensaio e o controlo à chegada, facto que contraria parcialmente o registado em 2010.

O Quadro 3.2 mostra que o índice GLSI calculado para os juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima e Vouga variou entre 1,34 e 2,04. O referido quadro mostra que juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga dos grupos controlo à chegada e controlo de salinidade 35 apresentavam índice branquio-somático (GLSI) ($\approx 2,0$) superior ao determinado nos restantes grupos de animais analisados neste ensaio e que não diferiam entre si ($p < 0,05$).

Por outro lado, o índice branquio-somático (GLSI) dos animais das bacias do Lima e Vouga capturados em 2010 (Ensaio I) e em 2011 (Ensaio II) expostos a salinidade 35 era da mesma ordem de grandeza. No que diz respeito aos juvenis da bacia do Lima capturados em 2010 observou-se um aumento deste parâmetro biométrico quer com o cativo quer com a exposição ao gradiente salinidade 35, perfil que não foi seguido em 2011 pelos animais da mesma bacia. Relativamente aos efetivos capturados na bacia do Vouga observou-se quer em 2010 quer em 2011 um decréscimo do parâmetro GLSI com a exposição ao gradiente de salinidade. O decréscimo do índice branquio-somático devido à exposição dos juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga, ao referido gradiente de salinidade, permite inferir maior dificuldade dos efetivos dessa bacia em se adaptarem ao sal, como previamente discutido no sub-capítulo 1.1. Essa perturbação poderá estar relacionada com pior qualidade do ambiente dulçaquícola a que os efetivos do Vouga estiveram expostos até à sua captura.

A partir do Quadro 3.2 pode observar-se que o fator de condição de Fulton K calculado para os juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e do Vouga, cujo comprimento variou entre 140 e 150 mm, assumiu valores entre 0,28 e 0,35 para os animais do Lima e entre 0,29 e 0,32 para os efetivos do Vouga, valores próximos dos calculados por Almeida (2008) (15) para uma amostragem semelhante de animais oriundos das referidas bacias.

O Quadro 3.2 permite ainda observar que o fator de condição de Fulton K calculado para os juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do grupo de controlo do ensaio para

salinidade 25 era superior ao calculado para os restantes grupos de animais das bacias Lima e Vouga. Por outro lado, os *transformers* da bacia do Vouga expostos a salinidade 10 apresentaram o menor valor de K de ambas as bacias em estudo. Surpreendentemente, os animais da bacia do Lima, expostos a salinidade 10 apresentavam um fator K superior ao seu controlo de ensaio.

Embora a exposição em cativeiro de juvenis de lampreia-marinha à salinidade tenha provocado no Ensaio I (2010) um aumento com significado estatístico do parâmetro K nos animais oriundos da bacia do Lima e um decréscimo significativo nos animais capturados na bacia do Vouga, esse perfil de resposta não foi confirmado no Ensaio II (2011) quer para os animais da bacia do Lima quer para os animais da bacia do Vouga. Esta diferença poderá estar relacionada com o melhor estado nutricional exibido à chegada pelos animais de qualquer das bacias eleitas para este estudo em 2011, eventualmente devido ao regime pluviométrico mais tardio registado em 2011 ter condicionado o início mais tardio da migração trófica.

Em suma, pode-se assumir que o comprimento, o peso corporal e o peso do fígado de juvenis de lampreia-marinha, das bacias do Lima e Vouga, não foram perturbados pela exposição a salinidade 10, 25 e 35. Contudo, a exposição dos efetivos da bacia do Lima a salinidade 10 provocou um decréscimo do índice hepato-somático, um aumento do peso das brânquias e do fator de condição de Fulton, parâmetro que diminuiu a salinidade 25. Por outro lado, nos animais da bacia do Vouga ocorreu um decréscimo do peso das brânquias e do índice branquio-somático a salinidade 35. Apesar da resposta ao gradiente de salinidade 35, em termos de parâmetros morfométricos, nem sempre se sobrepõe ao observado no Ensaio I, devido a condicionantes climáticos como a pluviosidade, o decréscimo do peso das brânquias e do índice branquio-somático, detetados em juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga, em ambos os ensaios, poderá determinar maior dificuldade destes animais em concluir com sucesso a migração trófica, comparativamente com os efetivos da bacia do Lima, cujo perfil de parâmetros morfométricos durante a aclimação à salinidade, se mostrou próximo do que se encontra descrito na bibliografia consultada e coerente com o que foi postulado no sub-capítulo 1.1 (44).

3.2.2. Biotransformação

3.2.2.1. Tecido hepático

Os isoenzimas fosfatase alcalina (ALP) reconhecem substratos com uma característica estrutural comum, um grupo fosfato localizado em posição terminal, que pode ser libertado para o meio celular ou transferido para um substrato aceitador. O perfil de expressão funcional destes enzimas depende da espécie, do tipo de tecido e das condições ambientais a que cada indivíduo se encontra exposto, sendo utilizado como marcador de biotransformação e de resposta ao *stress* pelos organismos do meio aquático, uma que vez reflete a mediação de processos biológicos fundamentais (82,83,89).

A Figura 3.8A mostra que atividade ALP hepática de *transformers* das bacias do Lima e do Vouga assumiu valores da mesma ordem de grandeza dos descritos na literatura para juvenis de *Argyrosomus regius* (319). A referida figura revela ainda que nas duas bacias, a atividade enzimática ALP do fígado de juvenis de lampreia-marinha pertencentes ao grupo controlo à chegada não diferia significativamente da detetada nos animais dos controlos de ensaio de salinidade e expostos a salinidade 10, 25 e 35, facto que permite inferir que as condições de cativeiro e a exposição ao gradiente de salinidade não perturbaram a mediação de processos biológicos hepáticos de *transformers* que envolvam a mediação de grupos fosfato disponibilizados pelos ALP.

O conteúdo em hemo presente no retículo endoplasmático hepático é usualmente considerado como um bom marcador dos níveis de citocromo P450 presentes nessa fração celular. Embora o conteúdo em hemo microsomal hepático, dos efetivos das bacias do Lima e do Vouga, pareça estar segregado em dois grupos distintos até salinidade 25, deixou-se de observar diferenças significativas entre os efetivos das duas bacias quando se evoluiu para salinidade 35, ocorrendo um decréscimo desse conteúdo nos efetivos do Lima, para níveis idênticos aos do Vouga (Figura 3.8B). Estes resultados apenas se sobrepõem com o que foi observado no Ensaio I para os juvenis do Vouga, uma vez que neste ensaio, os efetivos do Lima exibiam à chegada conteúdo em hemo, superior ao detetado no Ensaio I (Figura 3.1A).

Como referido anteriormente, a atividade enzimática CPR microsomal constitui um bom indicador da eficiência da transferência de equivalentes redutores que ocorre no ciclo mediado pelo citocromo P450 (79,309). Ao comparar a atividade enzimática CPR da fração microsomal do fígado de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e do Vouga com a literatura consultada, constata-se que Solé (2000) obteve valores superiores dessa atividade catalítica na mesma fração celular de indivíduos adultos da espécie piscícola *Cyprinus carpio*

(310). A Figura 3.8C, mostra que o cativoeiro e a exposição ao gradiente de salinidade 35 provocou um decréscimo da atividade CPR hepática dos juvenis da bacia do Lima, enquanto nos efetivos do Vouga apenas ocorreu um aumento significativo no grupo exposto a salinidade 35. O perfil de resposta ao gradiente de salinidade registado neste ensaio, não se sobrepôs ao que foi observado no Ensaio I, apesar do decréscimo da atividade CPR com o cativoeiro ser coincidente nos dois ensaios (Figura 3.1B).

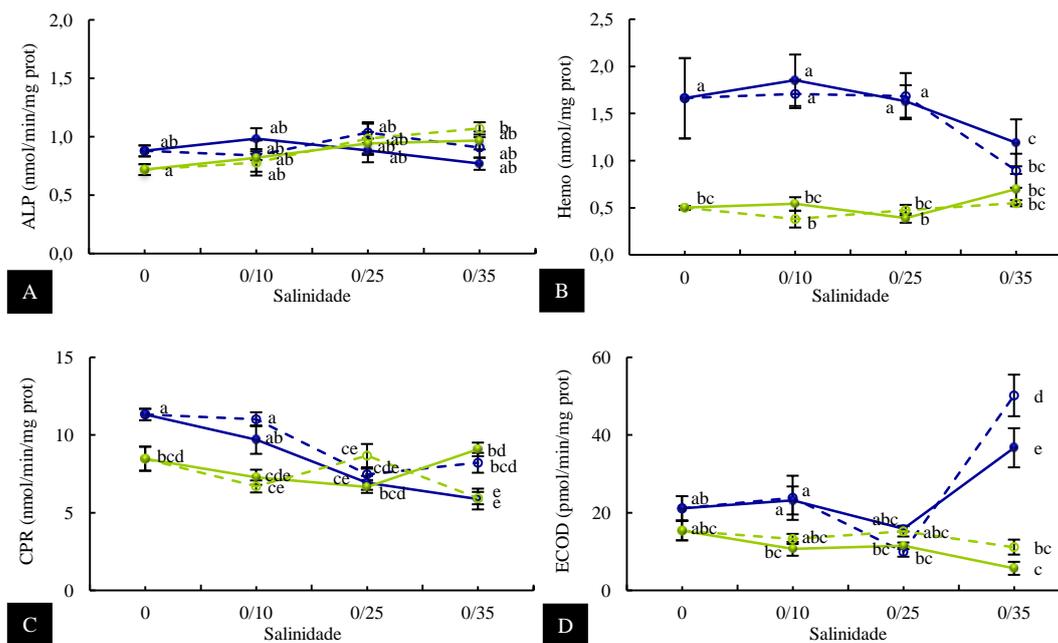


Figura 3.8 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol, conteúdo em hemo (B) e atividades enzimáticas CPR (C) e ECOD (D) da fração microsossal hepática de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II, no grupo controlo à chegada, controlo do ensaio salinidade 10, 25 ou 35 (linhas a tracejado) e expostos a salinidade 10, 25 ou 35 (linhas contínuas). Os resultados representam a média de 5 pools de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro pontos assinalados com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

Os citocromos P450 constituem uma família de isoenzimas fortemente implicada na metabolização de xenobióticos. A atividade ECOD microsossal exibida por membros da família I tem sido referida na literatura como um bom marcador de exposição a poluentes aromáticos. (54,79,119). A partir da Figura 3.8D pode observar-se que a exposição até salinidade 25 não afetou significativamente a atividade ECOD microsossal hepática dos animais das bacias do Lima e do Vouga. Contudo nos animais do Lima expostos a salinidade 35 detetou-se um decréscimo desta atividade enzimática que, no entanto, ficou acima do registado no controlo à chegada (Figura 3.8D). Contrariamente, ao que foi observado no Ensaio I, o cativoeiro, não introduziu alterações com significado estatístico desta atividade microsossal hepática dos animais capturados na bacia do Vouga. Curiosamente, o aumento

de atividade ECOD, descrito neste ensaio para os animais do Lima, coincide com o que foi observado no Ensaio I (Figura 3.1C). Fatores ambientais do seu habitat no período de pré-captura podem ter estado na origem das alterações de expressão funcional do enzima, uma vez que no Ensaio I, os juvenis dos grupos controlos à chegada destas duas bacias, exibiam o triplo da atividade ECOD determinada neste ensaio. Assim, os animais capturados em 2010 em ambas as bacias pareciam mais estimulados a responder ao contacto com xenobióticos aromáticos pelos P450 da família CYP 1A e 1B.

As vias de biotransformação incluem outros sistemas enzimáticos implicados no reconhecimento e modificação química de xenobióticos e/ou dos seus derivados, entre os quais se destacam os enzimas microsossomais UDPGT e GST microsossomais e citoplasmáticos, vulgarmente incluídos na Fase II (54,79). A Figura 3.9A mostra que a atividade enzimática UDPGT determinada na fração microsossomal do tecido hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima era da mesma ordem de grandeza que Solé (2000) determinou na mesma fração molecular de *Cyprinus carpio* adultos (310). A referida figura revela também que a atividade catalítica UDPGT hepática dos efetivos pertencentes aos grupos controlo do ensaio de salinidade 10 e 25, da bacia do Lima, aumentou significativamente durante o período de cativeiro, assumindo no final do ensaio valores idênticos aos do controlo à chegada ($p < 0,05$). A aclimação a salinidade 10 e 25 provocou um decréscimo da atividade UDPGT dos juvenis da bacia do Lima, ocorrendo o efeito inverso com a exposição a salinidade 35. A referida atividade catalítica também diminuiu nos efetivos do Vouga expostos a salinidade 25. O perfil de atividade UDPGT registado no Ensaio II contraria o que foi descrito para Ensaio I.

A Figura 3.9B revela que a atividade enzimática mGST hepática era inferior à detetada em embriões da espécie piscícola *Danio rerio* (313). Porém, pode-se constatar que os animais capturados na bacia do Lima exibiam à chegada atividade enzimática mGST hepática inferior à dos juvenis oriundos da bacia do Vouga ($p < 0,05$). A exposição a salinidade 10, 25 e 35 não perturbou significativamente esta atividade catalítica, exceto nos efetivos expostos ao gradiente de salinidade 35 onde aumentou. Os animais utilizados neste ensaio exibiam valores de atividade mGST inferiores (10 a 20x) aos detetados no Ensaio I (Figura 3.2B). Todavia, o perfil de resposta ao cativeiro e ao sal permaneceu idêntico nos animais das duas bacias, exceto nos efetivos da bacia do Vouga expostos a salinidade 35. As diferenças assinaladas podem ter sido condicionadas por alterações nos níveis de expressão do enzima mGST, determinados pelas condições do seu habitat (119).

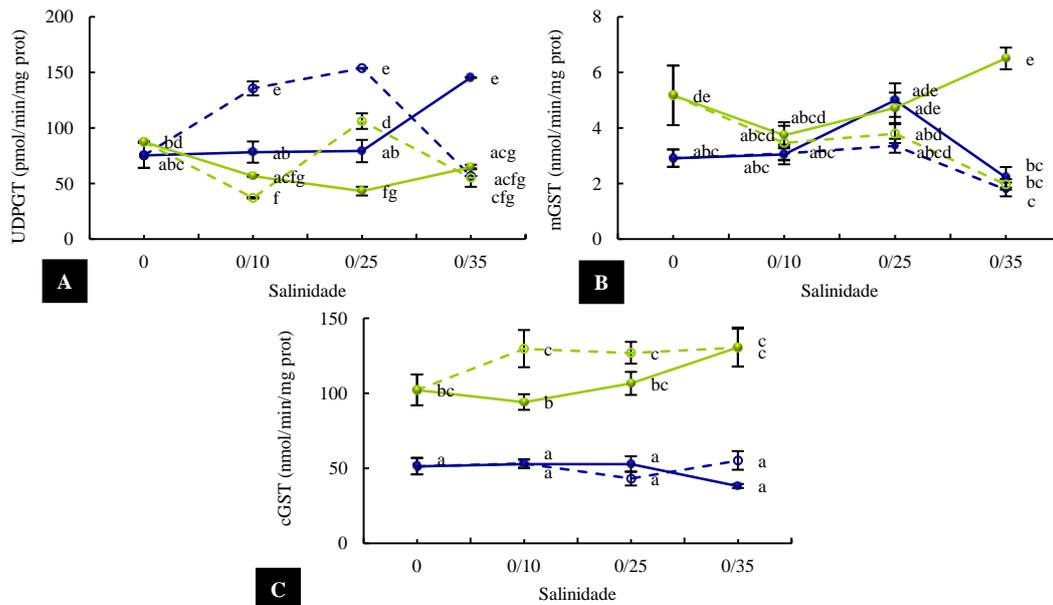


Figura 3.9 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II, no grupo controlo à chegada, controlo do ensaio salinidade 10, 25 ou 35 (linhas a tracejado) e expostos a salinidade 10, 25 ou 35 (linhas contínuas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro pontos assinalados com letras diferentes (a-g) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A atividade cGST do tecido hepático de juvenis de lampreia-marinha, capturados nas bacias do Lima e do Vouga, atingiu níveis próximos dos encontrados na literatura (Figura 3.9C) (194). O cativo e a exposição ao gradiente de salinidade 35 não perturbaram a atividade citoplasmática cGST hepática de juvenis de lampreia-marinha provenientes das bacias do Lima e Vouga. Curiosamente observou-se uma segregação dos efetivos de cada bacia, em termos de atividade cGST, sendo os juvenis do Vouga aqueles que apresentaram os valores mais elevados. Contudo, a atividade cGST registada neste ensaio era inferior aos detetados no Ensaio I (Figura 3.2C) ($p < 0,05$).

Além disso, no Ensaio I, a resposta ao gradiente de salinidade pelo tecido hepático dos indivíduos de ambas as bacias traduziu-se num decréscimo significativo da atividade cGST, resposta distinta da que foi descrita neste ensaio. A diferença aqui reportada entre o Ensaio I e o Ensaio II, para este parâmetro, permite inferir que os animais capturados em 2010 e 2011 constituem populações diferentes em termos de expressão funcional de glutatióno *S*-transferases, provavelmente regulada por mecanismos de indução distintos. Essas diferenças populacionais podem ter sido determinadas pela pluviosidade precoce registada em 2010 e/ou pela exposição das lampreias-marinhas parentais a poluentes do oceano Atlântico, antes de iniciarem a migração reprodutora.

3.2.2.2. Tecido branquial

O tecido branquial constitui nos juvenis de lampreia-marinha uma das principais vias de contacto com fatores ambientais exógenos, pelo que a caracterização de sistemas de biotransformação, em particular da Fase II, é frequentemente utilizada por diversos investigadores (320).

A atividade enzimática ALP branquial de juvenis das bacias do Lima e do Vouga, Figura 3.10, assumiu valores de ordem de grandeza muito inferior à descrita para os poucos exemplos encontrados na literatura como *Solea senegalensis* em fase larvar ou *Oreochromis sp* em fase adulta (89,321). A referida figura mostra também que a atividade enzimática ALP das brânquias de *transformers* pertencentes ao grupo controlo à chegada não diferia significativamente da detetada nos animais controlo de ensaio de salinidade e expostos a salinidade 10, 25 e 35, exceto no que diz respeito ao grupo exposto a salinidade 25 da bacia do Lima que se mostrou significativamente superior à do seu respetivo controlo de ensaio ($p < 0,05$). Mais uma vez, pode-se considerar que as condições de cativeiro e de exposição ao sal, não perturbaram a mediação de processos biológicos branquiais de *transformers* que envolvam grupos fosfato disponibilizados pelos ALP, apesar da divergência singular que se acabou de referir.

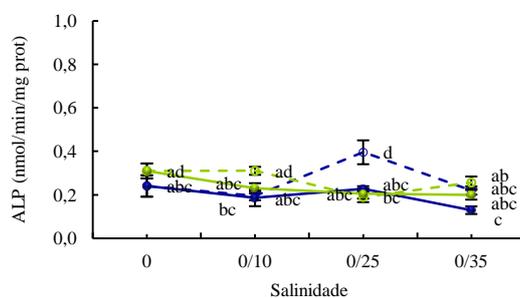


Figura 3.10 - Atividade enzimática ALP do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II, no grupo controlo à chegada, controlo do ensaio salinidade 10, 25 ou 35 (linhas a tracejado) e expostos a salinidade 10, 25 ou 35 (linhas contínuas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro pontos assinalados com letras diferentes (a-c) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A Figura 3.11A mostra que os juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima exibiam à chegada, atividade UDPGT branquial semelhante à determinada nos efetivos do Vouga, mas superiores aos encontrados na literatura (21). A referida figura representa também a evolução da atividade enzimática UDPGT com o cativeiro e/ou aclimação ao sal, ao longo do gradiente de salinidade 35. A partir da referida figura, pode-se constatar que o cativeiro provocou um aumento da atividade UDPGT branquial dos efetivos do Lima e do Vouga,

efeito apenas contrariado nos efetivos do grupo controlo de salinidade 35. A aclimação ao sal afetou negativamente a atividade UDPGT branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, expostos a salinidade 25, bem como a dos juvenis da bacia do Vouga, expostos a salinidade 10 e 25 ($p < 0,05$). Todavia, nos efetivos do Vouga, expostos a salinidade 35, ocorreu um aumento da referida atividade enzimática, para nível idêntico ao determinado nos efetivos do Lima ($p < 0,05$).

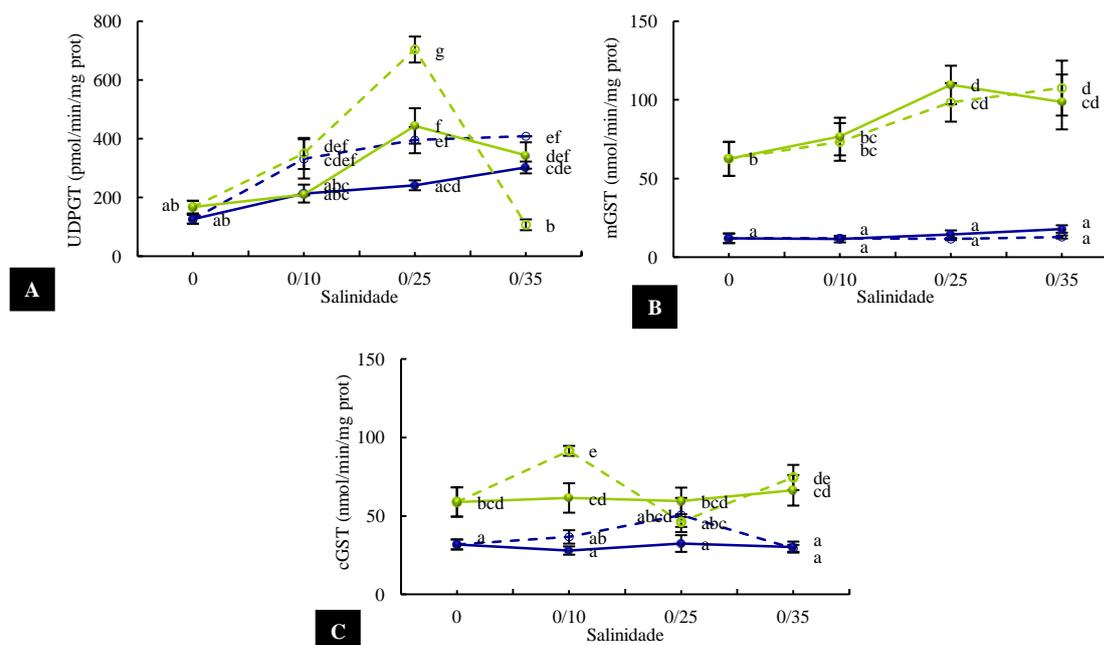


Figura 3.11 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II, no grupo controlo à chegada, controlo do ensaio salinidade 10, 25 ou 35 (linhas a tracejado) e expostos a salinidade 10, 25 ou 35 (linhas contínuas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro pontos assinalados com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

Como neste ensaio, a atividade UDPGT branquial dos juvenis das bacias do Lima e do Vouga expostos a salinidade 35, estabilizou em torno de 340 pmol/min/mg, pode-se especular que o gradiente de salinidade exerceu um efeito modulador na expressão funcional do enzima, compensando os efeitos adquiridos em ambiente dulçaquícola e dotando as brânquias desses animais com maior capacidade para participarem em reações que envolvam a conjugação de xenobióticos com o glicoronato, uma condição biológica importante para sobrevivência animal.

Contudo, os valores de atividade UDPGT registados neste ensaio eram inferiores aos determinados no Ensaio I (Figura 3.3A). Além disso, o perfil de resposta às condições de cativeiro e de exposição ao gradiente de salinidade também foi divergente.

A Figura 3.11B permite observar a ocorrência de dois níveis distintos de atividade mGST do tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha, apresentando os efetivos da bacia do Lima valores muito próximos dos encontrados na literatura e os animais do Vouga valores mais elevados (313). A referida figura mostra também que a aclimação a salinidade 35, não produziu efeitos significativos na atividade mGST branquial dos efetivos de ambas as bacias, apesar de o cativeiro ter levado a um aumento da referida atividade enzimática nos juvenis da bacia do Vouga ($p < 0,05$). Além disso, observou-se segregação dos animais das bacias do Lima e do Vouga, em termos de atividade mGST, em dois grupos distintos, quer à chegada, quer na exposição ao sal, quer nos respetivos controlos de ensaio de salinidade, ocorrendo sempre valores mais elevados dessa atividade catalítica nos juvenis do Vouga. Este perfil de resposta sugere que os juvenis da bacia do Vouga dispunham, no retículo endoplasmático, de um mecanismo de conjugação de xenobióticos com o glutatióno, mais ativo do que os efetivos do Lima.

Provavelmente, fatores ambientais da bacia do Vouga e de memória molecular dos juvenis da referida bacia terão contribuído, mais uma vez, para o efeito observado, uma vez que após o cativeiro ou a aclimação ao sal, os juvenis da bacia do Vouga, quer no Ensaio I (Figura 3.3B), quer no Ensaio II (Figura 3.11B), possuíam níveis de atividade mGST branquial superiores à dos animais da bacia do Lima. O contacto prévio com xenobióticos poderá ter ativado o mecanismo de expressão destes enzimas, provavelmente, ao nível dos recetores Ah.

De acordo com o que foi descrito anteriormente, a conjugação de xenobióticos com o tripéptido glutatióno pode também ser observada no citoplasma branquial, sendo mediada pela família de enzimas glutatióno *S*-transferase (cGST) (79). A Figura 3.11C mostra o perfil de atividade cGST, onde se encontram representados valores semelhantes aos publicados na literatura consultada (194). A referida figura revela também que a atividade cGST de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima não sofreu alterações significativas na adaptação ao cativeiro, nem ao gradiente de salinidade 35 ($p < 0,05$). Contudo, a atividade cGST branquial dos efetivos da bacia do Vouga mostrou um comportamento oscilatório entre salinidade 10 e 25, aparentemente modulado pela exposição ao sal. Além disso, observaram-se diferenças significativas entre a atividade cGST dos efetivos do Lima e do Vouga, quer à chegada quer a salinidade 35, condição que aponta para a influência de fatores ambientais distintos no ambiente dulçaquícola. À semelhança do que foi discutido para os enzimas mGST branquiais, o sistema de biotransformação dos juvenis capturados na bacia do Vouga, onde participa o glutatióno, parecia encontrar-se mais desperto do que nos animais da bacia do Lima.

A atividade cGST determinada à chegada, neste ensaio, era inferior à detetada em juvenis do Ensaio I (Figura 3.3C). O perfil de resposta ao cativo e ao gradiente de salinidade, também se revelou distinto. Condições ambientais, provavelmente determinadas por fenómenos atmosféricos poderão ter condicionado mecanismos de memória molecular nos efetivos de cada bacia. Todavia, o cativo ou a exposição ao gradiente de salinidade 35, mantiveram nos juvenis do Vouga, níveis de atividade cGST mais elevados. Tal facto permite inferir um maior contacto dos animais do Vouga com xenobióticos passíveis de serem metabolizados pelos enzimas cGST.

3.2.3. *Stress* oxidativo e defesas antioxidantes

3.2.3.1. Tecido hepático

Citoplasma

O conteúdo em glutationo (GSH) é frequentemente utilizado como um dos indicadores da capacidade de resposta antioxidante presente num determinado tecido. O conteúdo em GSH, GSSG e tióis totais não-proteicos quantificado no tecido hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga, eram próximos dos descritos em juvenis da espécie piscícola *Leporinus elongatus* (314) ou em lagostins (315).

Deste modo, a Figura 3.12A-C mostra que o conteúdo em GSH, GSSG e tióis-totais não proteicos de juvenis de lampreia-marinha oriundos da bacia do Lima dos grupos controlo à chegada e expostos a salinidade 10, 25 e 35 era superior ao quantificado nos animais da bacia do Vouga. Este facto poderá dever-se a um maior consumo do tripéptido, nos efetivos do Vouga, por vias de desintoxicação celular mediadas pelos enzimas de biotransformação mGST e cGST hepáticos. Além disso, o conteúdo em GSH dos animais de ambas as bacias não se alterou com a exposição ao sal ($p < 0,05$), uma resposta semelhante à que foi descrita para esta situação nos animais analisados no Ensaio I (Figura 3.4A).

A Figura 3.12B mostra ainda que o cativo não provocou alterações significativas no conteúdo em GSSG hepático dos juvenis da bacia do Vouga, mas provocou um aumento deste parâmetro nos efetivos do Lima, apenas no final do ensaio, um perfil de resposta idêntico ao detetado no Ensaio I. No entanto a salinidade 35 o conteúdo em GSSG e tióis totais não proteicos do tecido hepático dos efetivos do Lima era mais elevado nos animais sujeitos ao gradiente de salinidade do que no respetivo controlo de ensaio (Figura 3.12B e C), uma resposta distinta da detetada no Ensaio I (Figura 3.4B e C). A razão GSH/GSSG é referida por alguns autores como um bom indicador de *stress* oxidativo. A Figura 3.12D mostra que a

razão GSH/GSSG dos juvenis de lampreia marinha do Lima e do Vouga não apresentavam à chegada e após o cativeiro diferenças significativas. Embora, os efetivos da bacia do Lima não exibissem alterações significativas ao longo do gradiente de salinidade 35, os efetivos da bacia do Vouga expostos a salinidade igual ou superior a 25, apresentavam um decréscimo da referida razão, um sinal de que a aclimação a salinidade 25 ou superior induziu *stress* oxidativo ($p < 0,05$). Todavia, valores da razão GSH/GSSG inferiores a 1,4, o valor comum em eucariontes quando a determinação é feita pelo método Hissin (279), é indicador de *stress* oxidativo que pode, em parte, refletir a qualidade do ambiente dulçaquícola em que foram capturados. Um perfil semelhante foi detetado nos animais utilizados no Ensaio I (Figura 3.4D), embora os valores da razão, localizados entre 1,0 e 2,0, indiciem uma melhor qualidade do ambiente dulçaquícola de origem.

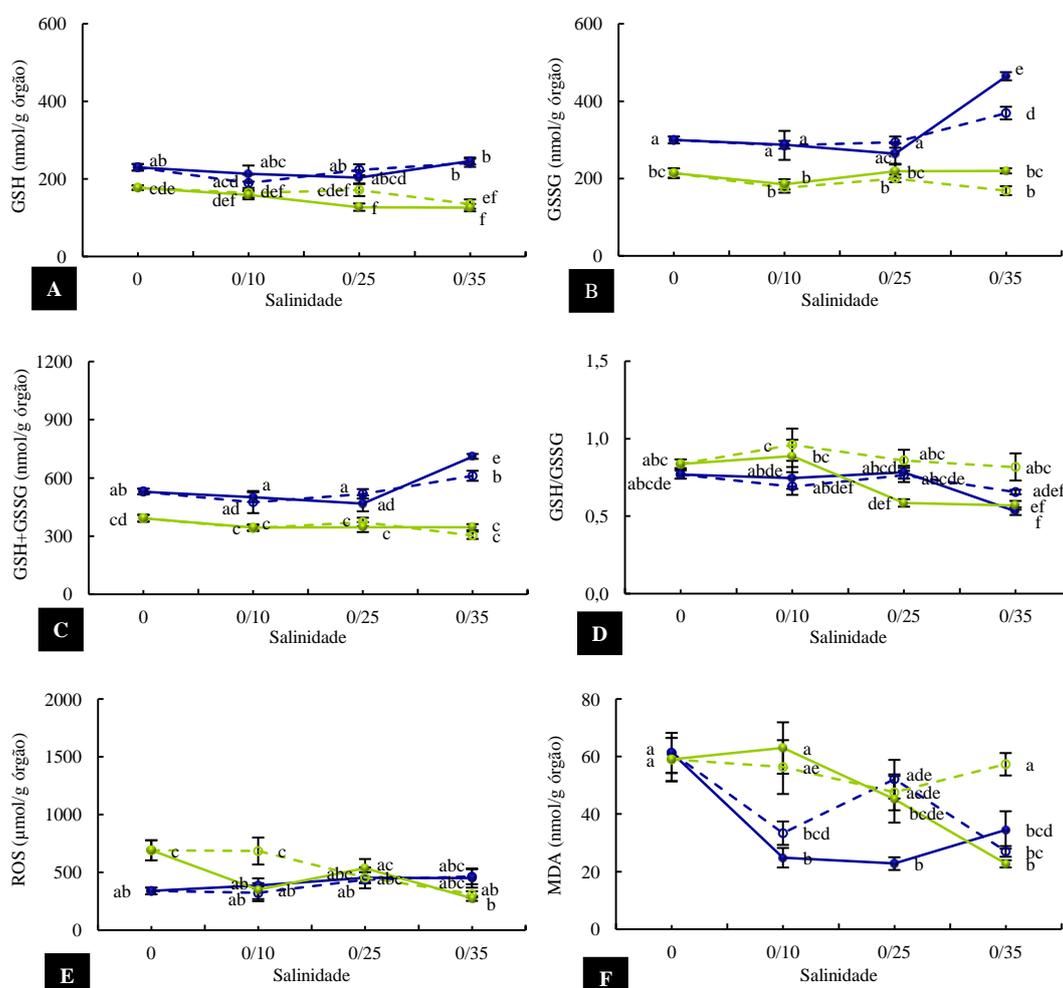


Figura 3.12 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II, no grupo controlo à chegada, controlo do ensaio salinidade 10, 25 ou 35 (linhas a tracejado) e expostos a salinidade 10, 25 ou 35 (linhas contínuas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro pontos assinalados com letras diferentes (a-f) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A determinação do conteúdo em ROS é também utilizada como marcador de *stress* oxidativo. A Figura 3.12E representa o conteúdo em peróxido de hidrogénio, frequentemente considerado como marcador do ROS total. A referida figura revela também que os níveis de ROS dos juvenis de lampreia-marinha, no grupo controlo à chegada da bacia Lima eram significativamente inferiores aos da bacia Vouga ($p < 0,05$). Pode observar-se ainda que as condições de cativeiro e a habituação ao sal não provocaram alterações significativas nos níveis de ROS hepático dos efetivos do Lima. Contudo, nos efetivos da bacia do Vouga, expostos a salinidade 10, ocorreu um decréscimo significativo desse conteúdo para valores próximos dos detetados nos juvenis da bacia do Lima. Um perfil de resposta idêntico ao observado no Ensaio I (Figura 3.4E). Destaca-se ainda que os níveis de ROS hepáticos determinados nos animais capturados neste ensaio eram superiores aos determinados no Ensaio I nos pontos de leitura comuns. Esta diferença dever-se-á, provavelmente, a alterações ambientais da bacia como a elevada pluviosidade precoce ocorrida em 2010 que condicionaram a resposta observada.

O MDA, um produto da peroxidação lipídica é frequentemente utilizado como marcador de danos celulares. A Figura 3.12F mostra que não existiam diferenças significativas no conteúdo de MDA de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e do Vouga pertencentes ao grupo controlo à chegada, tendo alcançado valores inferiores aos detetados em juvenis de *Leporinus elongatus* (314). No entanto, o cativeiro provocou um decréscimo significativo deste parâmetro hepático nos efetivos do Lima ($p < 0,05$). A exposição a salinidade 35 provocou um decréscimo do conteúdo em MDA hepático nos juvenis da bacia do Vouga, um indicador de menor ocorrência de danos oxidativos, eventualmente relacionada com o aumento da capacidade de desintoxicação de ROS, via mGST. O perfil de resposta ao gradiente de salinidade é distinto do que foi observado no Ensaio I (Figura 3.4F).

O ciclo de oxidação-redução do glutathione envolve duas enzimas: GR e GPx que asseguram maioritariamente a homeostase do glutathione (99). A Figura 3.13A representa a atividade catalítica GR ao longo do processo de aclimação ao sal e mostra valores inferiores aos consultados na literatura (169,314). A referida figura mostra que os níveis de atividade GR hepática não foram afetados pelas condições de cativeiro, nem pelo gradiente de salinidade 35 nos animais capturados na bacia do Lima. Nos efetivos da bacia do Vouga só foi observado um perfil de resposta idêntico ao cativeiro e ao gradiente de salinidade, até salinidade 25, uma vez que a 35 observou-se um aumento significativo desta atividade catalítica, para níveis próximos dos observados nos animais da bacia do Lima, ocorrendo

neste caso um aumento da capacidade de regeneração do GSH hepático, condicionada pela exposição ao sal. Outro aspeto a referir, prende-se com o facto dos níveis da atividade GR dos juvenis oriundos da bacia do Lima serem quase sempre estatisticamente superiores aos detetados em efetivos oriundos da bacia do Vouga, facto que pode ter contribuído para os níveis de estado estacionário mais elevados de GSH nos animais da bacia do Lima ($p < 0,05$).

A estabilização da atividade GR hepática de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e do Vouga com o cativoiro, observada neste ensaio contraria a variação observada no Ensaio I (Figura 3.5A). Por outro lado, o aumento da atividade GR detetado, neste ensaio, nos efetivos do Vouga expostos ao gradiente de salinidade 35, não coincide com a estabilidade da referida atividade catalítica observada nos juvenis dessa bacia no Ensaio I.

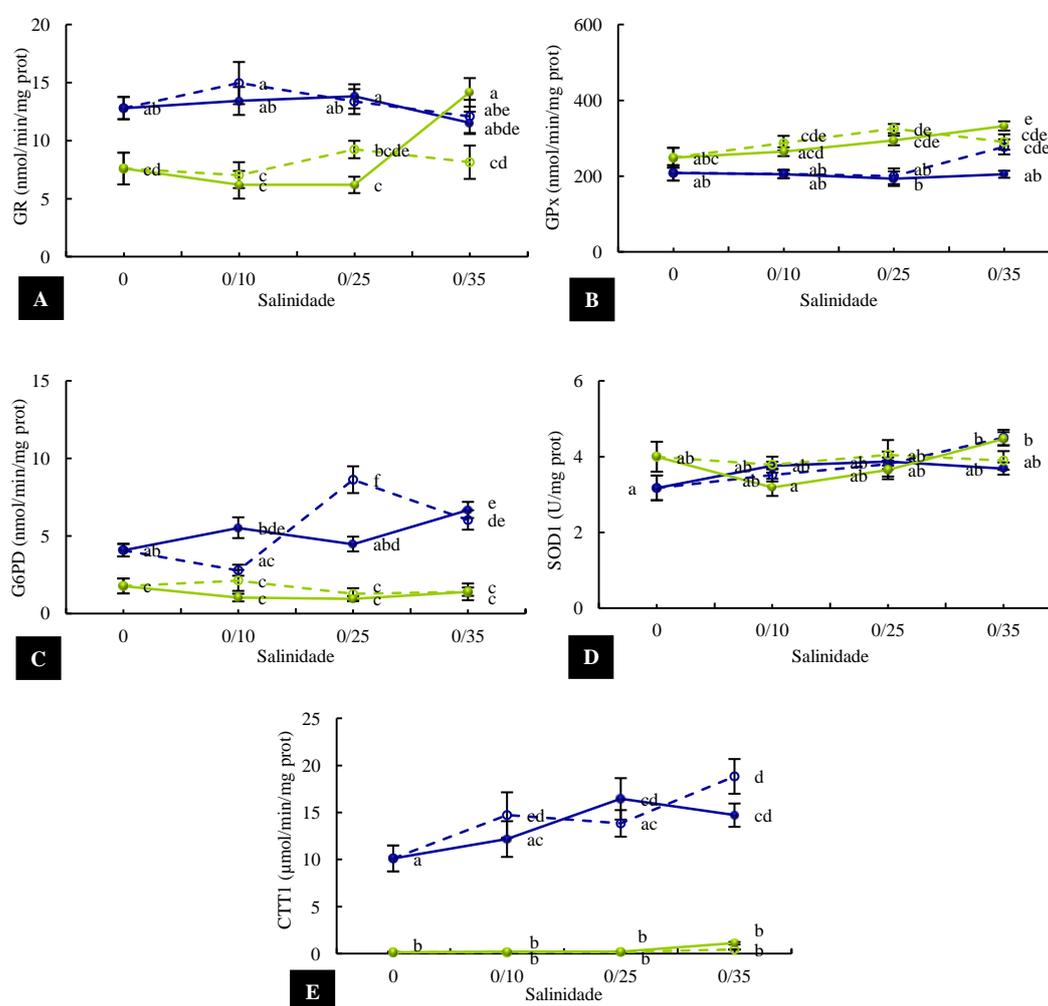


Figura 3.13 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II, no grupo controlo à chegada, controlo do ensaio salinidade 10, 25 ou 35 (linhas a tracejado) e expostos a salinidade 10, 25 ou 35 (linhas contínuas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro pontos assinalados com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A partir da Figura 3.13B pode observar-se que os níveis de atividade GPx dos efetivos capturados nas bacias do Lima e Vouga não sofreram alterações significativas com o cativeiro ou com a exposição ao gradiente de salinidade, com exceção da resposta a salinidade 35 pelos animais do Lima, onde a atividade GPx diminuiu. A presença de sal parece ter contrariado alterações nesta atividade catalítica condicionada pelo cativeiro. O decréscimo da atividade GPx detetado neste ensaio, nos juvenis da bacia do Lima, expostos a salinidade 35, não coincidiu com o que tinha sido previamente observado no Ensaio I (Figura 3.5B).

Considerando que a via das pentoses-fosfato e em particular o enzima G6PD, constituem um dos principais fornecedores de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao funcionamento do ciclo do glutationo (99), tornou-se pertinente avaliar a sua resposta nas condições descritas neste estudo. A Figura 3.13C revela que a atividade G6PD hepática, detetada à chegada e ao longo do gradiente de salinidade, em juvenis da bacia do Lima foi sempre mais elevada do que a dos efetivos do Vouga ($p < 0,05$), evidenciando, em qualquer dos casos, valores inferiores aos encontrados na literatura (322). As condições de cativeiro não perturbaram a atividade G6PD hepática dos animais da bacia do Vouga, mas provocaram um aumento da referida atividade catalítica, nos efetivos da bacia do Lima. Os níveis mais elevados de atividade G6PD em qualquer dos instantes de análise, poderão ter assistido com mais eficácia ao funcionamento do ciclo do glutationo, condicionando o aumento dos níveis hepáticos do tripéptido, prevenindo assim a ocorrência de stress oxidativo no fígado dos efetivos do Lima. Em geral, a aclimação ao sal não perturbou a atividade G6PD hepática dos animais das bacias do Lima e do Vouga, embora a salinidade 10 e 25 a atividade G6PD dos juvenis do Lima tenha aumentado e diminuído, respetivamente, face ao controlo de ensaio.

O perfil de resposta da atividade G6PD hepática ao gradiente de salinidade 35, descrito neste ensaio é idêntico ao observado no Ensaio I (Figura 3.5C), isto é, na ausência de alterações significativas da referida atividade catalítica nos juvenis das bacias do Lima e do Vouga.

Os metalo-enzimas SOD, metabolicamente localizados a montante das peroxidases, participam na dismutação do radical anião superóxido a peróxido de hidrogénio, minimizando os efeitos nocivos desse radical. O radical anião superóxido, uma espécie reativa de oxigénio que pode formar-se por diversos processos bióticos e abióticos, tem sido correlacionado com a peroxidação lipídica e o envelhecimento celular (175). Os enzimas SOD1 de localização citoplasmática desempenham assim um papel relevante na desintoxicação do radical anião

superóxido gerado por peroxidases citoplasmáticas e sistemas de biotransformação localizados no retículo endoplasmático (177).

A atividade catalítica SOD1 hepática de juvenis das bacias do Lima e do Vouga, Figura 3.13D, assumiu valores da mesma ordem de grandeza da descrita na literatura para *Oreochromis mossambicus* adultos (323). A referida figura revela ainda que a atividade SOD1 do fígado de juvenis de lampreia-marinha, pertencentes ao grupo controlo à chegada, não diferia significativamente da detetada nos animais controlo de ensaio de salinidade e expostos a salinidade 10, 25 e 35 ($p < 0,05$), facto que permite inferir que as condições de cativeiro e a exposição ao gradiente salinidade 35 poderão não ter afetado esta via de desintoxicação do radical anião superóxido do citoplasma hepático de *transformers*.

A Figura 3.13E mostra que a atividade CTT1 dos juvenis de lampreia-marinha capturados na bacia do Lima sofreu um aumento significativo com o cativeiro, mas não foi afetada pelo gradiente de salinidade 35. Por outro lado, os juvenis provenientes da bacia do Vouga exibiam níveis de atividade CTT1 estatisticamente inferiores aos determinados nos animais da bacia do Lima. Os níveis vestigiais desta atividade catalítica hepática sugerem que no caso dos efetivos do Vouga a desintoxicação do peróxido de hidrogénio e lipoperóxidos decorreu predominantemente via GPx, enquanto nos efetivos do Lima a atividade CTT1 parece dar uma melhor contribuição. Deste modo, observou-se a segregação dos animais de cada bacia em termos de atividade antioxidante catalase hepática. O perfil de resposta ao gradiente de salinidade 35, quer no Ensaio I (Figura 3.5D), quer neste ensaio, foram semelhantes. Na bibliografia consultada, também se detetaram níveis de atividade CTT1 citosólica da mesma ordem de grandeza da determinada no tecido hepático, de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima (194). Num desses casos, a exposição de indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae* a águas provenientes de uma região com intensa atividade agrícola, determinou um aumento significativo da referida atividade catalítica (186,194).

3.2.3.2. Tecido branquial

O tecido branquial é descrito várias vezes na literatura como aquele que melhor responde a fatores de *stress*, por ser uma primeira frente de contacto nos organismos aquáticos. Os conteúdos em GSH, GSSG e tióis totais não-proteicos quantificados no tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga, eram próximos dos encontrados na literatura para outra espécie piscícola, como foi o caso de juvenis de *Leporinus elongatus* (314) ou em lagostins (315).

A Figura 3.14A mostra que o conteúdo em GSH branquial de juvenis de lampreia-marinha capturados nas bacias do Lima e do Vouga não foi perturbado pelas condições de cativeiro. Embora a aclimação ao sal não tenha afetado o conteúdo em GSH branquial dos efetivos do Vouga, efeito semelhante só ocorreu nos juvenis do Lima expostos até salinidade 25, uma vez que a salinidade 35 detetou-se um aumento desse conteúdo ($p < 0,05$). No entanto, os animais da bacia do Lima apresentavam, em qualquer dos instantes de análise, níveis de GSH estatisticamente superiores aos detetados nos animais da bacia do Vouga ($\sim 2x$), facto que aponta para a existência de maior capacidade de defesa antioxidante, no primeiro grupo de animais.

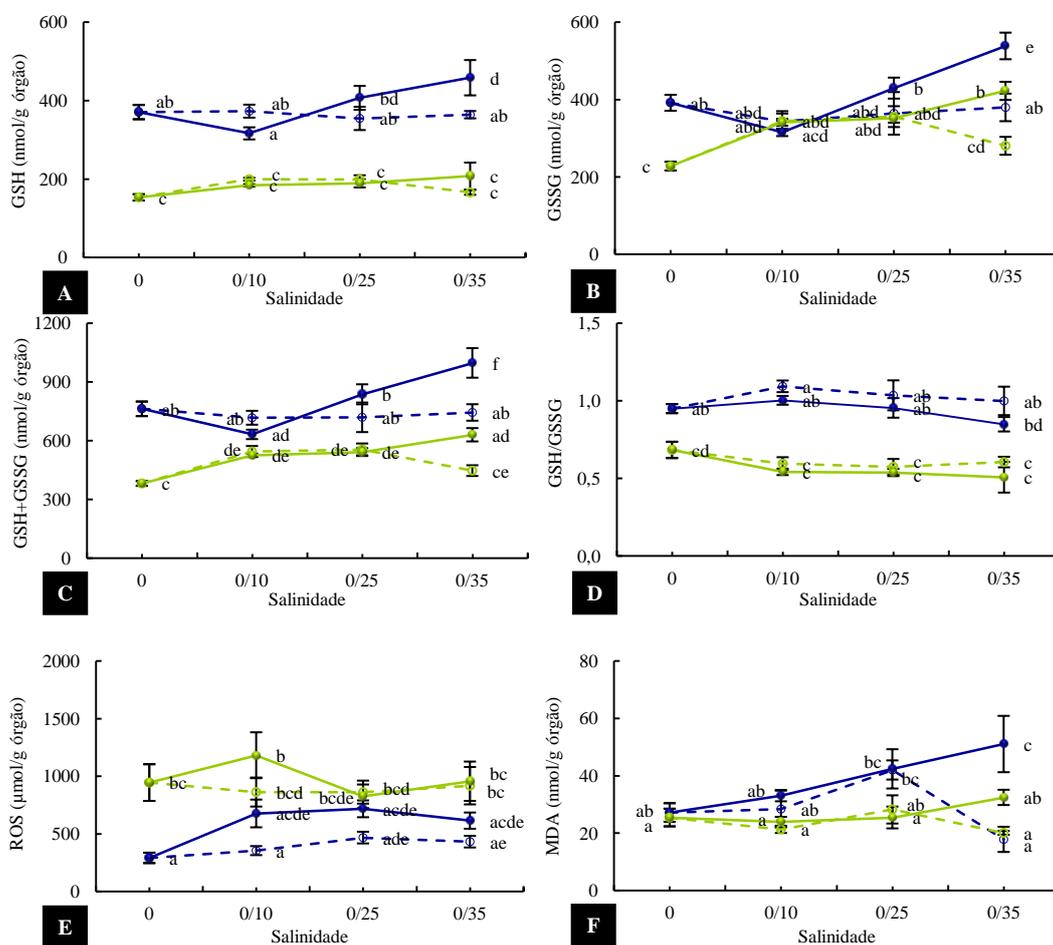


Figura 3.14 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II, no grupo controlo à chegada, controlo do ensaio salinidade 10, 25 ou 35 (linhas a tracejado) e expostos a salinidade 10, 25 ou 35 (linhas contínuas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro pontos assinalados com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A partir da Figura 3.14B pode observar-se que o conteúdo em GSSG dos efetivos da bacia do Lima não foi estatisticamente afetado pelas condições de cativeiro ($p < 0,05$). O

mesmo aconteceu com o grupo de animais sujeitos a gradiente salinidade 10 e 25, uma vez que era estatisticamente idêntico ao dos controlos à chegada e de ensaio ($p < 0,05$). No entanto, a salinidade 35 ocorreu um aumento do referido conteúdo nos efetivos de ambas as bacias, embora permanecesse menor nos juvenis da bacia do Vouga ($p < 0,05$). O perfil de resposta ao gradiente de salinidade 35 descrito para os efetivos do Lima e do Vouga foi diferente do descrito no Ensaio I (Figura 3.6B), onde não se observaram alterações significativas com o gradiente de salinidade 35 ($p < 0,05$).

O conteúdo em tióis totais não proteicos branquial dos efetivos da bacia do Lima, representado graficamente na Figura 3.14C não sofreu alterações significativas pelo cativoiro ($p < 0,05$). Embora a exposição a salinidade 10 e 25 não tenha gerado alterações com significado estatístico, o conteúdo em GSH + GSSG, a salinidade 35 era superior ao do seu controlo de ensaio ($p < 0,05$). O cativoiro, quer no Ensaio I, quer neste ensaio, não provocou alterações com significado estatístico no conteúdo total em tióis não proteicos dos animais da bacia do Lima ($p < 0,05$). Contudo, a exposição ao gradiente de salinidade 35 divergiu do que tinha sido observado no Ensaio I, uma vez que neste ensaio, a exposição a salinidade 35 provocou um aumento do referido conteúdo (Figura 3.6C) ($p < 0,05$). O facto de os níveis de tióis totais não proteicos dos animais da bacia do Lima serem, em qualquer dos grupos analisados, estatisticamente superiores aos dos efetivos congêneres do Vouga, permite inferir que um fator externo poderá ter estimulado um maior consumo de enxofre não proteico nos efetivos da bacia do Vouga, via mGST e/ou cGST.

A Figura 3.14D mostra que a razão GSH/GSSG branquial dos animais de qualquer das bacias analisadas neste ensaio, não foi afetada pelo cativoiro, nem pela exposição à salinidade, resposta distinta da detetada no Ensaio I (Figura 3.6C) ($p < 0,05$). Por outro lado, o valor da razão GSH/GSSG branquial determinado nos juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, em qualquer dos instantes de análise, foi sempre estatisticamente superior ao dos efetivos da bacia do Vouga ($p < 0,05$). Embora se possa admitir que os animais do Lima se encontravam em condições de *stress* oxidativo, uma vez que a referida razão era inferior a 1,4, o estado de *stress* oxidativo dos efetivos da bacia do Vouga, permaneceu muito superior aos dos animais capturados na bacia do Lima.

O conteúdo em ROS das brânquias (Figura 3.14E) era, à chegada, significativamente mais elevado nos juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga ($p < 0,05$), facto que confirma o que foi discutido da Figura 3.14D, relativamente ao estado de *stress* oxidativo dos juvenis da bacia do Vouga. O conteúdo em RSO das brânquias de juvenis de lampreia-marinha, de qualquer das bacias, não foi significativamente afetado pelo cativoiro ou

pela exposição ao gradiente de salinidade (Figura 3.14E) ($p < 0,05$), perfil de resposta comum ao que foi detetado no Ensaio I (Figura 3.6E).

A Figura 3.14F mostra que o conteúdo em MDA detetado à chegada, no tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima e do Vouga era estatisticamente semelhante ($p < 0,05$) e da mesma ordem de grandeza da detetada em juvenis de *Leporinus elongatus* (314). A referida figura mostra que as condições de cativeiro e a exposição ao sal não afetaram o conteúdo em MDA branquial, exceto no caso dos efetivos da bacia do Lima expostos a salinidade 35 que apresentavam níveis de MDA estatisticamente superiores aos do controlo de Ensaio, bem como aos de qualquer dos grupos da bacia do Vouga ($p < 0,05$). Este perfil é comum ao que foi descrito, neste ensaio, para o conteúdo em GSSG, uma possível justificação para o aumento de danos oxidativos no tecido branquial. Porém, o referido perfil não se assemelha ao detetado no Ensaio I (Figura 3.6F), onde no caso dos juvenis do Lima, a exposição a salinidade 35, reverteu o conteúdo em MDA para valores semelhantes aos detetados à chegada e, no caso dos efetivos do Vouga, o cativeiro induziu um aumento desse conteúdo.

A atividade GR branquial (Figura 3.15A) do ciclo do glutationo, de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e do Vouga, não sofreu alterações significativas pelo cativeiro ou pela exposição ao gradiente de salinidade, não se detetando também diferenças com significado estatístico entre os efetivos de qualquer das bacias, um perfil de resposta idêntico ao observado no Ensaio I (Figura 3.7A), para os efetivos da bacia do Lima. Além disso, os valores de atividade GR aqui discutidos mostraram-se inferiores aos detetados na fração pós-mitocondrial de tecido branquial de *Wallago attu* (169).

A Figura 3.15B revela que a atividade GPx detetada à chegada, no tecido branquial de juvenis das bacias Lima e do Vouga era estatisticamente semelhante ($p < 0,05$) e da mesma ordem de grandeza dos valores detetados na literatura (169). A dita figura revela também que o cativeiro provocou um decréscimo significativo da atividade GPx branquial de *transformers* da bacia do Lima, resposta distinta da que foi observada nos efetivos da bacia do Vouga, onde não ocorreram alterações significativas ($p < 0,05$). Por outro lado, a exposição a salinidade 35, levou a um aumento da atividade GPx, nos efetivos da bacia do Vouga. Este perfil de resposta mostrou-se distinto do que foi detetado no Ensaio I (Figura 3.7B), onde a aclimação ao sal provocou um decréscimo significativo da atividade GPx em ambas as bacias ($p < 0,05$). Considerando que os valores do controlo à chegada, determinados no Ensaio I, eram superiores aos determinados neste ensaio, poderá admitir-se estar a estimar-se populações diferentes, devido a condições climáticas distintas do habitat em cada ano de ensaio.

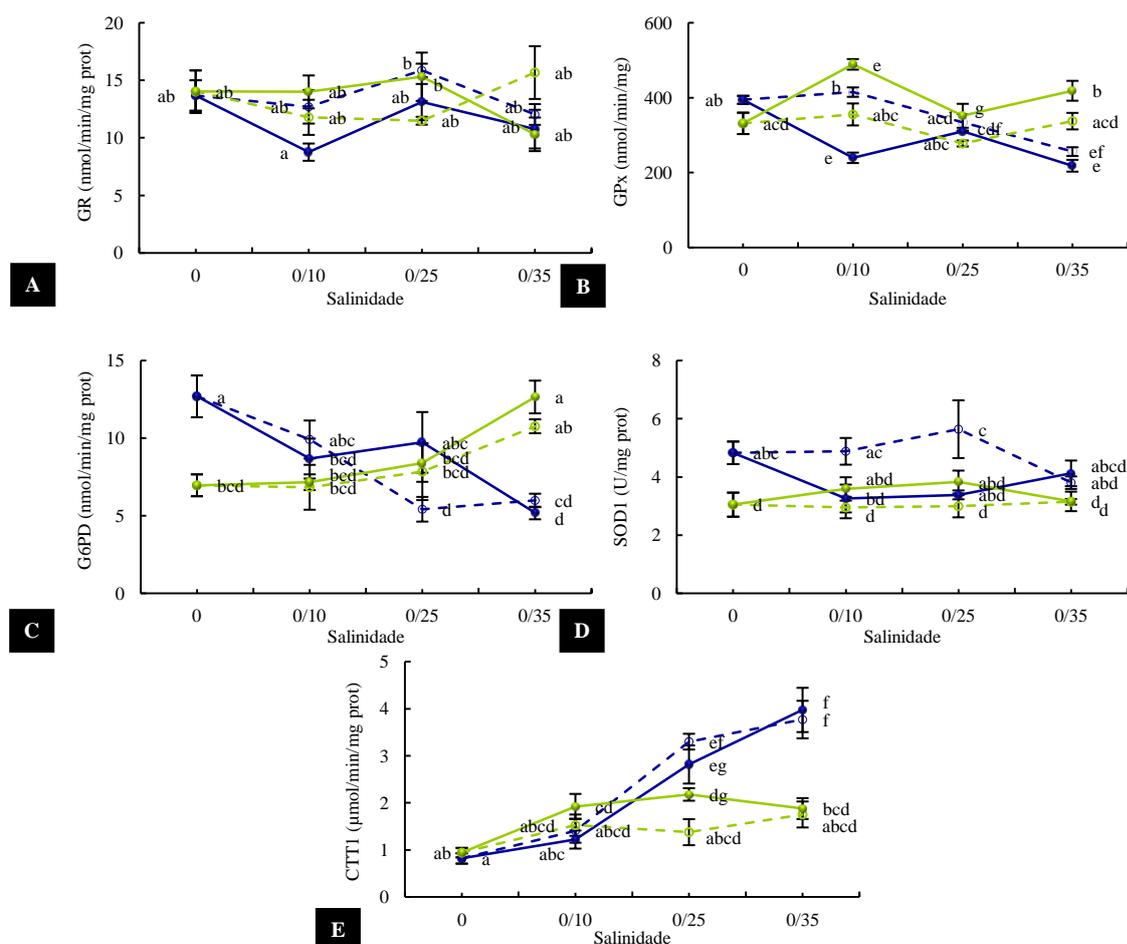


Figura 3.15 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias Lima (azul escuro) e Vouga (verde claro), do Ensaio II, no grupo controlo à chegada, controlo do ensaio salinidade 10, 25 ou 35 (linhas a tracejado) e expostos a salinidade 10, 25 ou 35 (linhas contínuas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro pontos assinalados com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan (p < 0,05).

A atividade enzimática G6PD branquial de *transformers* da bacia do Lima era superior à detetada nos efetivos da bacia do Vouga (Figura 3.15C) e inferior à descrita pela literatura (169). A referida figura mostra também que o cativoiro provocou um decréscimo significativo da atividade G6PD branquial de *transformers* da bacia do Lima, resposta divergente da detetada nos animais da bacia do Vouga que não variou (p < 0,05). Apenas a exposição a salinidade 25 provocou um aumento significativo da atividade G6PD dos efetivos do Lima. Contudo, no final do ensaio os juvenis do Lima possuíam atividade G6PD significativamente inferior à determinada no controlo chegada (p < 0,05). Esta diferença parece justificar em parte os níveis elevados do conteúdo em GSSG discutidos anteriormente, uma vez que a quebra na disponibilidade de equivalentes redutores, necessários à regeneração do GSSG em GSH pelo ciclo do glutatono, poderá ter contribuído para esse efeito. Estes resultados

também divergiram do que foi observado no Ensaio I (Figura 3.7C), onde a atividade G6PD diminuiu nos efetivos da bacia do Lima expostos a salinidade 35.

Embora, a atividade enzimática SOD1 branquial de juvenis de lampreia-marinha do Lima fosse estatisticamente superior à determinada nos efetivos do Vouga (Figura 3.15D), era em qualquer dos casos de ordem de grandeza idêntica à descrita para *Oreochromis mossambicus* adultos ($p < 0,05$) (323). A referida figura mostra ainda que o cativeiro e a exposição ao gradiente de salinidade 35 não afetaram significativamente a atividade SOD1 dos animais oriundos da bacia do Vouga ($p < 0,05$). Contudo, *transformers* do Lima, expostos a salinidade 10 e 25 exibiam atividade SOD1 significativamente inferior à detetada nos respetivos controlos de ensaio ($p < 0,05$).

A Figura 3.15E permite observar que à chegada, a atividade CTT1 branquial de juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e do Vouga não apresentavam diferenças estatísticas ($p < 0,05$), assumindo valores da mesma ordem de grandeza dos determinados por Vieira (2014), autor que também observou um aumento dessa atividade enzimática com a exposição a poluentes (194). A partir da dita figura pode-se ainda constatar que o cativeiro provocou um aumento da atividade CTT1 branquial dos efetivos da bacia do Lima, mas não afetou os efetivos da bacia do Vouga ($p < 0,05$).

Por outro lado, a aclimação ao sal não perturbou a atividade CTT1 de *transformers* das duas bacias aqui analisadas ($p < 0,05$). Contudo, a atividade CTT1 dos juvenis do Lima, expostos a salinidade 25 ou superior era mais elevada do que a determinada nos efetivos do Vouga. Este facto permite inferir que a desintoxicação do peróxido de hidrogénio, via CTT1, nos animais da bacia do Lima encontrava-se melhor assegurada por este enzima. Neste ensaio, o perfil de atividade CTT1 dos efetivos da bacia do Lima, apenas não coincidiu com o que foi descrito no Ensaio I para o cativeiro (Figura 3.7D).

Contudo, a ausência de alterações significativas quer com o cativeiro quer com a exposição à salinidade na bacia do Vouga, diverge do que foi discutido para o Ensaio I, onde a exposição à salinidade nessa bacia, provocou um aumento desta atividade catalítica.

3.3. Caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III)

Os resultados abordados neste sub-capítulo (Ensaio III) permitem descrever como juvenis de lampreia-marinha, sem contacto prévio com o ambiente salino, responderam a vários níveis de exposição de atrazina ao longo de 30 dias. Neste ensaio, *transformers* oriundos da bacia do Lima foram homogeneamente organizados em 6 grupos de tratamentos distintos, conforme previamente descrito no sub-capítulo 2.3 e designados por: “controlo à chegada”, “controlo do ensaio”, “exposto à atrazina 1 µg/L”, “exposto à atrazina 10 µg/L”, “exposto à atrazina 50 µg/L” e “exposto à atrazina 100 µg/L”. A determinação de parâmetros morfométricos, bem como de conteúdos e atividades enzimáticas de biotransformação e de resposta ao *stress* oxidativo pelo tecido hepático e branquial foi realizada em cada grupo de animais.

A caracterização morfométrica e bioquímica aqui descrita incluem parâmetros idênticos aos que foram analisados nos Ensaio I e II. Para além disso, inclui ainda marcadores de *stress* oxidativo hepáticos e branquiais, como o conteúdo em GSH, GSSG, GSH+GSSG, ROS e MDA, a razão GSH/GSSG e as atividades enzimáticas GPx e SOD2 mitocondriais.

3.3.1. Biometria

O TL (144 - 150 mm) e o TW (4,05 - 4,69 g) de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima analisados neste ensaio (Quadro 3.3) são próximos dos descritos pela literatura para macroftalmias capturadas nas mesmas condições de temperatura e período de captura (10,15,49,304). O mesmo quadro mostra ainda que o contacto de macroftalmias com a atrazina (1, 10, 50 e 100 µg/L) em ambiente dulçaquícola controlado, não provocou alterações com significado estatístico nos parâmetros morfométricos comprimento e peso corporal ($p < 0,05$).

O LW (0,0284 - 0,0365 g) e o índice HSI (0,667-0,780 g) (Quadro 3.3), calculado para juvenis de lampreia-marinha que participaram neste ensaio são da mesma ordem de grandeza dos descritos em publicações científicas (10,15,23,49,304). O valor de HSI permitiu confirmar o estágio de desenvolvimento dos animais capturados na bacia do rio Lima de acordo com a bibliografia consultada Al-Ghais (2013), Pedro (2013) e Wang (2013) (255, 258, 266).

O peso do fígado e o parâmetro HSI de macroftalmias dos grupos controlo à chegada, controlo do ensaio, e expostos a atrazina 1, 10 e 50 µg/L, não diferiam significativamente entre si (Quadro 3.3). Apenas os efetivos expostos a atrazina 100 µg/L exibiam peso do fígado e valores de HSI significativamente inferiores aos efetivos do controlo do ensaio, diferença que pode indiciar efeitos hepatotóxicos, para este nível de exposição ao produto fitofarmacêutico.

Quadro 3.3 – Parâmetros morfométricos de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio III no grupo controlo à chegada (Grupo 1), controlo do ensaio (Grupo 2), exposto a atrazina 1µg/L (Grupo 3), exposto a atrazina 10µg/L (Grupo 4), exposto a atrazina 50µg/L (Grupo 5), exposto a atrazina 100µg/L (Grupo 6). Os resultados representam a média de 24 animais em cada grupo ± erro padrão da média. As médias de uma mesma coluna assinaladas com letras diferentes (a-d) são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Duncan (p <0,05).

Bacia	Grupo	ATZ	TL (mm)	TW (g)	LW (g)	HSI (%)	GW (g)	GLSI (%)	K
Lima	1	0	150±2,9 ^a	4,69±0,16 ^a	0,0365±0,0013 ^a	0,78±0,02 ^a	0,0968±0,0044 ^a	2,12±0,12 ^a	0,29±0,01 ^a
	2	0	145±1,8 ^a	4,39±0,14 ^{ab}	0,0333±0,0012 ^{ab}	0,76±0,01 ^a	0,0721±0,0047 ^b	1,60±0,07 ^b	0,28±0,00 ^a
	3	1	144±1,6 ^a	4,18±0,14 ^{ab}	0,0304±0,0011 ^{bcd}	0,73±0,01 ^{ab}	0,0693±0,0032 ^b	1,65±0,04 ^b	0,27±0,00 ^a
	4	10	144±1,9 ^a	4,12±0,16 ^{ab}	0,0311±0,0012 ^{bcd}	0,76±0,02 ^a	0,0615±0,0031 ^b	1,48±0,04 ^b	0,27±0,00 ^a
	5	50	144±1,3 ^a	4,05±0,12 ^{ab}	0,0291±0,0010 ^{bcd}	0,72±0,02 ^{ab}	0,0703±0,0026 ^b	1,74±0,04 ^b	0,27±0,00 ^a
	6	100	145±1,4 ^a	4,27±0,11 ^b	0,0284±0,0009 ^c	0,67±0,01 ^b	0,0711±0,0024 ^b	1,66±0,03 ^b	0,28±0,00 ^a

Concentração de atrazina em µg/L (ATZ), Comprimento corporal (TL), peso corporal (TW), peso do fígado (LW), índice hepato-somático (HSI), peso das brânquias (GW), índice branquio-somático (GLSI) e fator de condição de Fulton (K).

O Quadro 3.3 permite observar que neste ensaio, o GW e o índice GLSI variaram entre 0,0615 g e 0,0968 g e entre 1,48 e 2,12, respetivamente. A partir do referido quadro pode também observar-se que o grupo controlo à chegada de *transformers* da bacia do Lima apresentava GW e índice GLSI significativamente superior ao dos outros grupos de animais, controlo e expostos a atrazina que não diferiam entre si (p <0,05). As condições de cativeiro poderão ter sido a causa provável desse tipo de resposta.

O fator de condição de Fulton calculado neste ensaio, para os 6 grupos de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, eram significativamente semelhantes, apresentando valores entre 0,27 e 0,29 próximos dos encontrados na literatura (271).

Assim, o contacto de macroftalmias da bacia do Lima com a atrazina (1, 10, 50 e 100 µg/L) em ambiente dulçaquícola controlado, não afetou o TL, o TW e do LW, os índices HSI e GLSI, assim como o fator de condição de Fulton K. Apenas os efetivos expostos a atrazina (100 µg/L), exibiam LW e valores de HSI inferiores aos efetivos dos restantes grupos, diferença que pode indiciar efeitos hepatotóxicos provocados por este nível de exposição ao produto fitofarmacêutico, um potencial candidato a biomarcador de exposição.

3.3.2. Biotransformação

Esta aproximação teve como principal preocupação analisar e discutir os resultados obtidos em laboratório com juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima expostos a diferentes níveis de concentração de atrazina em ambiente dulçaquícola. Nesse contexto, tem o seu início com a leitura e discussão dos resultados relativos a sistemas de biotransformação do tecido hepático, sub-capítulo 3.3.2.1., prosseguindo com a leitura e interpretação dos resultados relativos a sistemas de biotransformação do tecido branquial, sub-capítulo 3.3.2.2.

3.3.2.1. Tecido hepático

A partir da Figura 3.16A podemos observar que todos os grupos de juvenis de lampreia-marinha expostos à atrazina (1-100 µg/L) em ambiente dulçaquícola, apresentavam atividade ALP hepática idêntica à dos grupos controlo à chegada e de ensaio, apesar de este último grupo de animais possuírem atividade ALP superior à detetada à chegada ($p < 0,05$), mas em qualquer dos casos próxima dos valores encontrados na literatura consultada (88,89). Assim, pode-se assumir que a capacidade hepática para disponibilizar grupos fosfato não foi perturbada pela exposição à atrazina em água doce. Como o metabolismo energético da célula depende maioritariamente de reações deste tipo, pode-se especular que essa função não foi perturbada pela triazina no tempo e nível de exposição descritos neste ensaio.

A Figura 3.16B mostra que o conteúdo em hemo microsomal hepático de macroftalmias não foi afetado pela exposição à atrazina (1-100 µg/L) em ambiente dulçaquícola ($p < 0,05$). O perfil de resposta aqui descrito para o conteúdo em hemo microsomal sugere que o cativo e a exposição à atrazina em ambiente dulçaquícola, não perturbaram o nível de expressão de hemotiolatoenzimas microsomias ($p < 0,05$).

A Figura 3.16C revela que a atividade enzimática CPR da fração microsomal hepática de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima era inferior à da literatura consultada (310). A partir da referida figura, pode-se constatar que a exposição à atrazina (10 e 100 µg/L) em água doce provocou um decréscimo significativo da atividade CPR hepática ($p < 0,05$). Nessas condições ensaio, a triazina poderá ter bloqueado o fluxo de equivalentes redutores desde o coenzima NADPH até aos citocromos P450, efeito mais evidenciado para o nível de exposição mais elevado ($p < 0,05$).

Os resultados representados na Figura 3.16D mostram que a atividade ECOD não foi perturbada pelo cativo, nem pela exposição à atrazina (1-100 µg/L) ($p < 0,05$). Esta resposta dever-se-á, por um lado, a esta atividade enzimática microsomal hepática ser também de

expressão constitutiva, e por outro, ter sido insensível à presença deste contaminante quando ainda se encontravam em água doce.

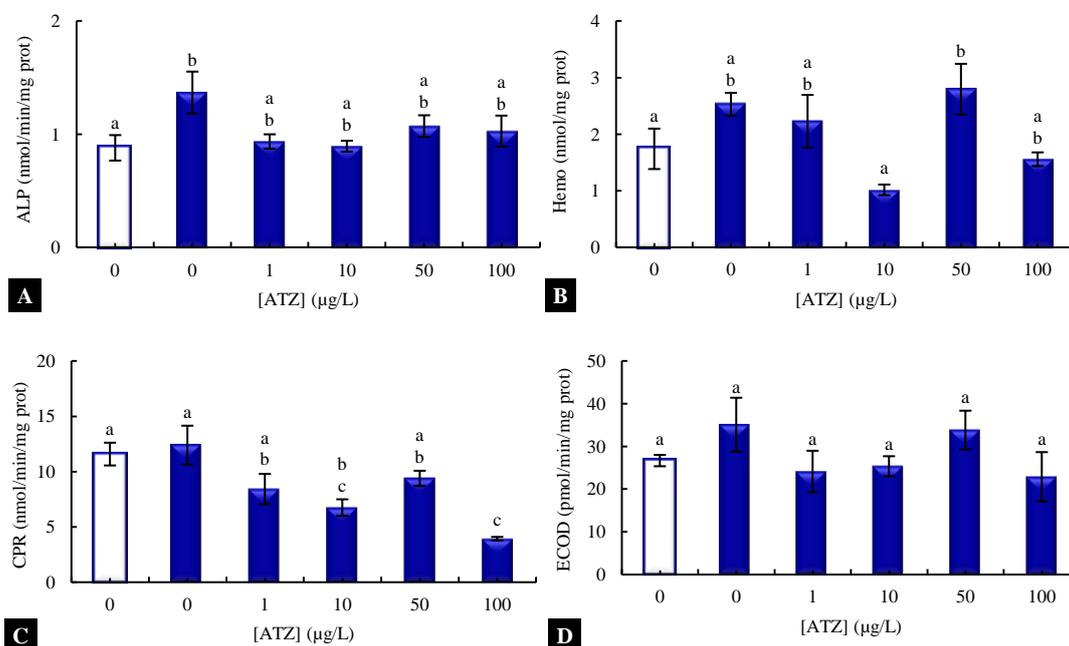


Figura 3.16 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol, conteúdo em hemo (B) e atividades enzimáticas CPR (C) e ECOD (D) da fração microsomal hepática de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio III no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 µg/L) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 8# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-c) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

As reações de conjugação constituem uma importante via de defesa contra xenobióticos. No retículo endoplasmático hepático as atividades UDPGT e GST de espécies piscícolas assumem em geral um papel relevante na desintoxicação de poluentes (79). A Figura 3.17A mostra que apenas a exposição a atrazina (1 µg/L) provocou um aumento significativo da atividade catalítica UDPGT hepática ($p < 0,05$). Deste modo, os hepatócitos de juvenis de lampreia-marinha não mostraram elevada sensibilidade à atrazina em ambiente dulçaquícola, sobretudo para níveis de concentração igual ou superior a 10 µg/L.

Os enzimas mGST e cGST catalisam a conjugação do glutationo com xenobióticos, outra reação importante da segunda fase de biotransformação (79). Os valores de atividade mGST hepática de juvenis de lampreia-marinha representados na Figura 3.17B são da mesma ordem de grandeza dos descritos pela literatura (313). A referida figura revela que o contacto com a triazina provocou um aumento da atividade mGST hepática, ocorrendo a variação mais elevada nos animais expostos a atrazina (50 e 100 µg/L) em ambiente dulçaquícola ($p < 0,05$). Estes resultados indiciam que o aumento de atividade catalítica mGST poderá ter resultado da indução monofuncional do enzima por complexos recetores nucleares diferentes do complexo

AhR, uma vez que não se detetou indução concertada com as atividades CPR e ECOD. Esta resposta microsossomal poderá ter contribuído para uma melhor sobrevivência de *transformers* à atrazina, em ambiente dulçaquícola, devido ao aumento da capacidade de desintoxicação hepática de produtos fitofarmacêuticos da família das triazinas.

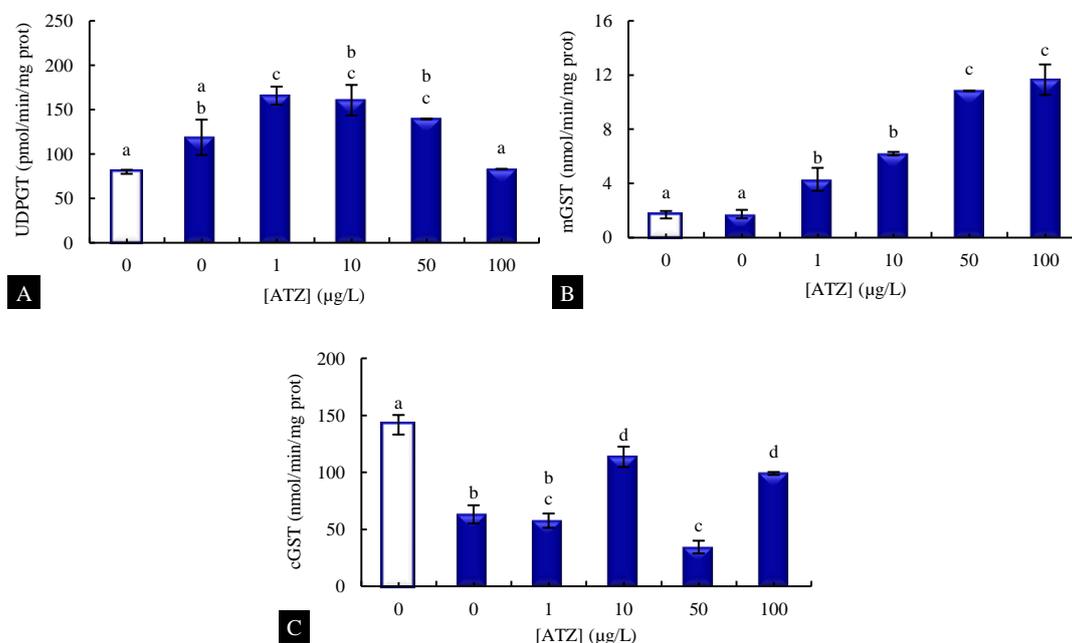


Figura 3.17 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol hepáticos de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 µg/L) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 8# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-c) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A atividade cGST hepática de juvenis de lampreia-marinha, determinada neste ensaio, variou entre 34,3 e 142 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ prot (Figura 3.17C), valores próximos dos descritos pela literatura (311). O efeito provocado pela exposição à triazina foi distinto do detetado com a mGST hepática, uma vez que o cativoiro provocou um decréscimo da atividade cGST para níveis inferiores aos detetados à chegada. A exposição a atrazina (10 e 100 µg/L) em água doce, levou a um aumento da referida atividade catalítica para níveis superiores aos do controlo de ensaio, enquanto a exposição a atrazina (50 µg/L) despoletou o efeito inverso ($p < 0,05$). Este tipo de alterações podem ter sido influenciadas pela forma como a atrazina modulou a expressão génica das subunidades que constituem os heterodímeros que asseguram a atividade GST do citoplasma hepático. O efeito inibitório, exercido pela atrazina sobre a atividade cGST, poderá ter sido compensado pela atividade desintoxicante da congénere microsossomal, em particular para a exposição de atrazina (50 µg/L).

A atividade mGST do retículo endoplasmático hepático de juvenis de lampreia-marinha, foi de todos os parâmetros de biotransformação analisados, aquele que respondeu de forma inequívoca à triazina, candidatando-se a constituir um bom biomarcador de contacto com a atrazina em meio dulçaquícola. Embora atividades enzimáticas hepáticas, como a cGST e a UDPGT permitissem indiciar alguma sensibilidade dos juvenis de lampreia-marinha a este produto fitofarmacêutico, não deram respostas tão claras como a mGST.

3.3.2.2. Tecido branquial

A partir da Figura 3.18 pode-se observar que a atividade ALP branquial corresponde aproximadamente à quinta parte dos valores de atividade ALP do tecido hepático e não foi afetada pela exposição à atrazina ($p < 0,05$). A disponibilização de grupos fosfato mediada pela ALP branquial, não foi afetada pela exposição à atrazina em água doce, parecendo, por esse motivo, desempenhar um papel mais importante no tecido hepático de juvenis de lampreia-marinha.

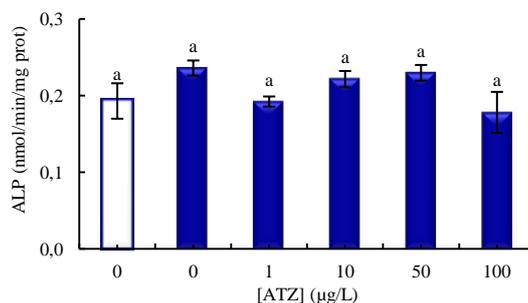


Figura 3.18 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III, no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 µg/L) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-e) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A Figura 3.19A revela que a atividade UDPGT branquial era três a cinco vezes superior à determinada no tecido hepático. Estes resultados apontam para um papel relevante destes enzimas no tecido branquial, eventualmente justificado por serem eficazes na desintoxicação celular de um tecido que em espécies piscícolas corresponde à primeira linha de contacto com contaminantes ambientais. A referida figura mostra ainda que a atividade UDPGT do controlo de ensaio era significativamente inferior à detetada nas brânquias de juvenis do controlo à chegada, não se observando qualquer relação de dependência com a exposição à atrazina em ambiente dulçaquícola ($p < 0,05$).

Como referido anteriormente, outro sistema relevante de biotransformação de xenobióticos inclui diversas famílias de isoenzimas que promovem a conjugação desses compostos com o glutationo, como acontece com os enzimas GST (79). Deste modo, a Figura 3.19B revela que a atividade mGST branquial era semelhante à descrita pela literatura (313), sendo uma vez e meia a três vezes superior à que foi detetado no tecido hepático. No entanto, contrariamente ao que foi observado no tecido hepático, não se detetaram alterações significativas desta atividade catalítica entre qualquer dos grupos estudados ($p < 0,05$).

A atividade cGST branquial (Figura 3.19C) de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima diminuiu significativamente nos animais expostos à atrazina (10, 50 e 100 $\mu\text{g/L}$) em ambiente dulçaquícola, não tendo sido observadas diferenças com significado estatístico entre os animais controlo à chegada e controlo ensaio, bem como entre os animais expostos à atrazina (1 $\mu\text{g/L}$) e respetivos controlos ($p < 0,05$).

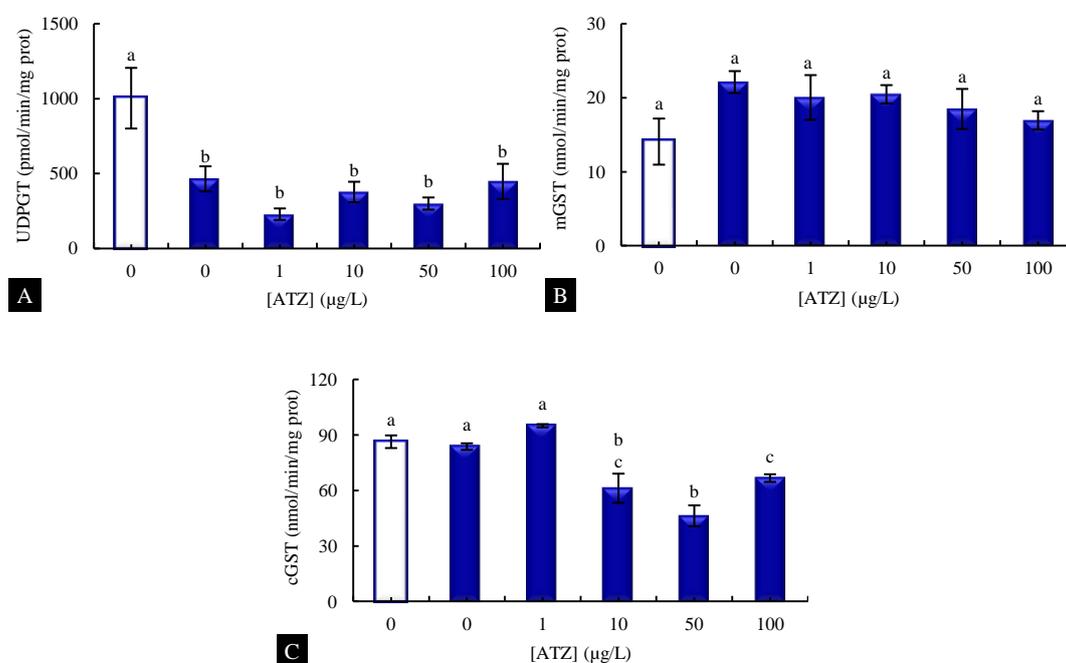


Figura 3.19 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III, no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 $\mu\text{g/L}$) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-c) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

Tal como descrito na literatura (311) para diversas espécies piscícolas, esta atividade catalítica parece ter exibido elevada sensibilidade à atrazina, em particular para níveis de exposição iguais ou superiores a 10 $\mu\text{g/L}$ em água doce. Considerando que a atividade média das brânquias era idêntica à detetada no tecido hepático, pode-se inferir a relevância deste sistema de biotransformação para a integridade destes tecidos, eliminando xenobióticos. Contudo, os efeitos observados no tecido branquial e no tecido hepático podem comprometer

essa capacidade, caso os animais ainda em água doce sejam expostos acidental ou permanentemente a níveis de atrazina iguais ou superiores a 10 µg/L. Pode-se ainda acrescentar que a atividade enzimática cGST branquial poderá constituir um bom biomarcador de exposição à atrazina de juvenis de lampreia-marinha, quando ainda não contataram com o ambiente salino.

3.3.3. *Stress* oxidativo e defesas antioxidantes

3.3.3.1. Tecido hepático

Citoplasma

O contacto do tecido hepático de espécies piscícolas com agentes químicos exógenos pode em alguns casos criar condições para a ocorrência de *stress* oxidativo. Por esse motivo, houve a preocupação de avaliar parâmetros indicadores do estado redox, danos celulares e capacidade antioxidante dos hepatócitos de juvenis de lampreia-marinha expostos à atrazina. Os conteúdos em GSH, GSSG e tióis totais não-proteicos do citoplasma hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia Lima (Figura 3.10 A-C) eram próximos dos encontrados na literatura para outra espécie piscícola, como foi o caso de juvenis de *Leporinus elongatus* (314), ou de espécies de lagostins (315).

A Figura 3.20A revela que os animais que estiveram expostos à atrazina (1 µg/L), em ambiente dulçaquícola, exibiam níveis de GSH citoplasmático significativamente inferiores aos dos controlos e de qualquer dos restantes tratamentos ($p < 0,05$). Por outro lado, os juvenis expostos a atrazina 10 e 50 µg/L apresentavam níveis de GSH citoplasmáticos idênticos aos dos animais controlo de ensaio. Embora pareça que as condições de cativeiro possam ter contribuído para o decréscimo do conteúdo em GSH citoplasmático hepático, os animais expostos ao nível mais elevado de atrazina (100 µg/L) exibiam uma reversão desse efeito ($p < 0,05$). Assim, embora a exposição a níveis de concentração baixos de atrazina, possa ter comprometido a disponibilidade citoplasmática hepática do tripéptido, o aumento da concentração do xenobiótico parece ter induzido a sua biossíntese para eventualmente ser utilizado como co-substrato dos enzimas GST.

Surpreendentemente, a Figura 3.20B mostra que o conteúdo em GSSG dos animais expostos à atrazina (1-100 µg/L), em água doce, era estatisticamente semelhante ao dos animais pertencentes aos grupos controlo, não diferindo entre si ($p < 0,05$).

A partir da Figura 3.20C pode-se constatar que o cativeiro provocou um decréscimo significativo do conteúdo em tióis totais não-proteicos citoplasmáticos hepáticos de

transformers da bacia do Lima, mas a exposição à atrazina (100 µg/L), em ambiente dulçaquícola, provocou um aumento com significado estatístico ($p < 0,05$).

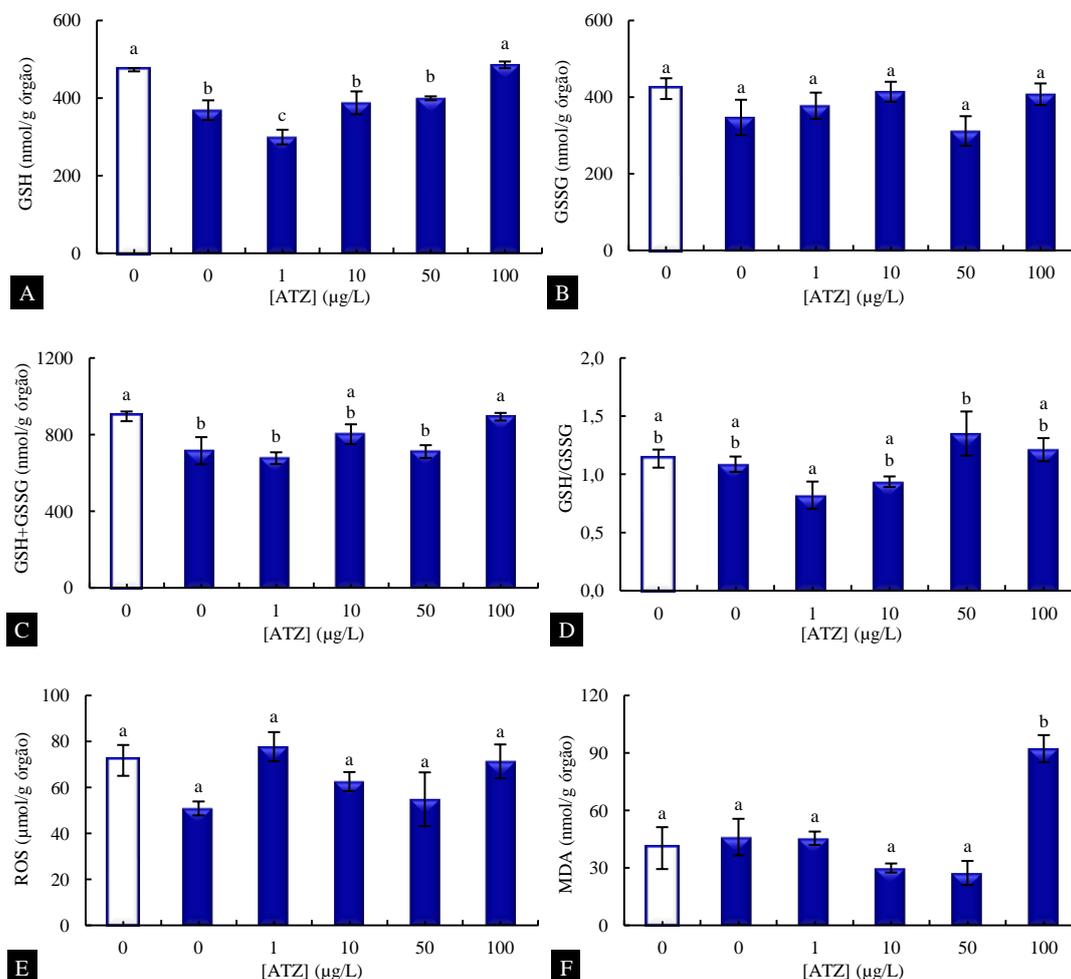


Figura 3.20 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III, no grupo controle à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 µg/L) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-c) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

O citoplasma hepático de juvenis de lampreia-marinha sujeitos atrazina (1-100 µg/L), em ambiente dulçaquícola, não apresentava alterações do estado redox intracelular mediado pelo GSH, GSH/GSSG, ROS, sugerindo que nas referidas condições experimentais não foi despoletado *stress* oxidativo (Figura 3.20D e E). Os resultados obtidos são da mesma ordem de grandeza dos que se encontram descritos na literatura para a razão GSH/GSSG determinada em *Anguilla anguilla* (197) e conteúdo em ROS de “*Antarctic fishes*” (316).

A Figura 3.20F revela que não se detetaram diferenças significativas entre os níveis de MDA hepáticos dos juvenis expostos à atrazina e os respetivos controlos, exceto nos animais expostos a atrazina (100 µg/L), cujo nível de MDA hepático era duas vezes superior ao

controlo de ensaio ($p < 0,05$). Este resultado surpreendente parece não ter uma explicação diretamente relacionada com os níveis de ROS estimados em termos de quantidade de peróxido de hidrogénio e de potencial redox estabilizado pelo GSH. Uma explicação para esta alteração remete-se para o papel da atrazina como princípio ativo de herbicidas em que se comporta como inibidor da cadeia de transporte de eletrões do cloroplasto. É possível que esse mecanismo possa igualmente atuar sobre outras cadeias de transporte de eletrões com localização membranar, muito provavelmente ao nível do retículo endoplasmático. Como referido no sub-capítulo 3.3.2.1 a atividade enzimática CPR do retículo endoplasmático hepático sofreu um decréscimo significativo nos animais que contactaram com a atrazina (100 $\mu\text{g/L}$). O bloqueio da cadeia de transporte de eletrões localizada no retículo pode ter contribuído para gerar espécies reativas de oxigénio, que não o H_2O_2 , como o radical hidroxilo, uma espécie reativa capaz de desencadear a peroxidação lipídica, e que tem como produto final, entre outros, o MDA

No que diz respeito à resposta antioxidante mediada pelo enzima GR, a Figura 3.21A mostra que a exposição de juvenis de lampreia-marinha à atrazina provocou um decréscimo significativo dessa atividade catalítica, comparativamente com o controlo de ensaio ($p < 0,05$). Este perfil de resposta parece constituir um bom marcador de exposição à triazina em ambiente dulçaquícola que no caso da atrazina mostrou-se sensível a níveis de exposição entre 1 e 100 $\mu\text{g/L}$. A atividade GPx do citoplasma hepático de juvenis de lampreia-marinha, da bacia do Lima, não foi afetada pelo cativeiro, nem pela exposição à atrazina (1-50 $\mu\text{g/L}$) em água doce. Apenas os efetivos que contactaram com atrazina (100 $\mu\text{g/L}$) exibiam um valor de atividade catalítica significativamente inferior ao dos controlos e ao dos restantes tratamentos (Figura 3.21B) ($p < 0,05$). O referido decréscimo desta atividade enzimática poderá, em parte, justificar o aumento do conteúdo em MDA discutido anteriormente. Assim parece plausível utilizar esta atividade enzimática como marcadora de exposição à triazina, em ambiente dulçaquícola, para nível de exposição igual ou superior a 100 $\mu\text{g/L}$.

A Figura 3.21C mostra que *transformers* expostos a atrazina (50 $\mu\text{g/L}$) apresentavam atividade G6PD significativamente superior à que foi determinada nos grupos controlo e expostos a atrazina (1 e 10 $\mu\text{g/L}$), não diferindo dos animais sujeitos ao nível de concentração mais elevado que foi utilizado neste ensaio. Porém, a atividade G6PD representada na referida figura era inferior à encontrada na literatura consultada para *Oreochromis niloticus* (322).

A tentativa dos hepatócitos de juvenis de lampreia-marinha ampliarem a sua disponibilidade em equivalentes redutores não parece ter sido dirigida ao seu usual consumidor, o ciclo do glutatióno, uma vez que o fluxo de eletrões encontrava-se

parcialmente bloqueado ao nível do enzima GR. Provavelmente estaria a ser mobilizado pela biossíntese *de novo* de lípidos, uma via que assiste à proliferação celular.

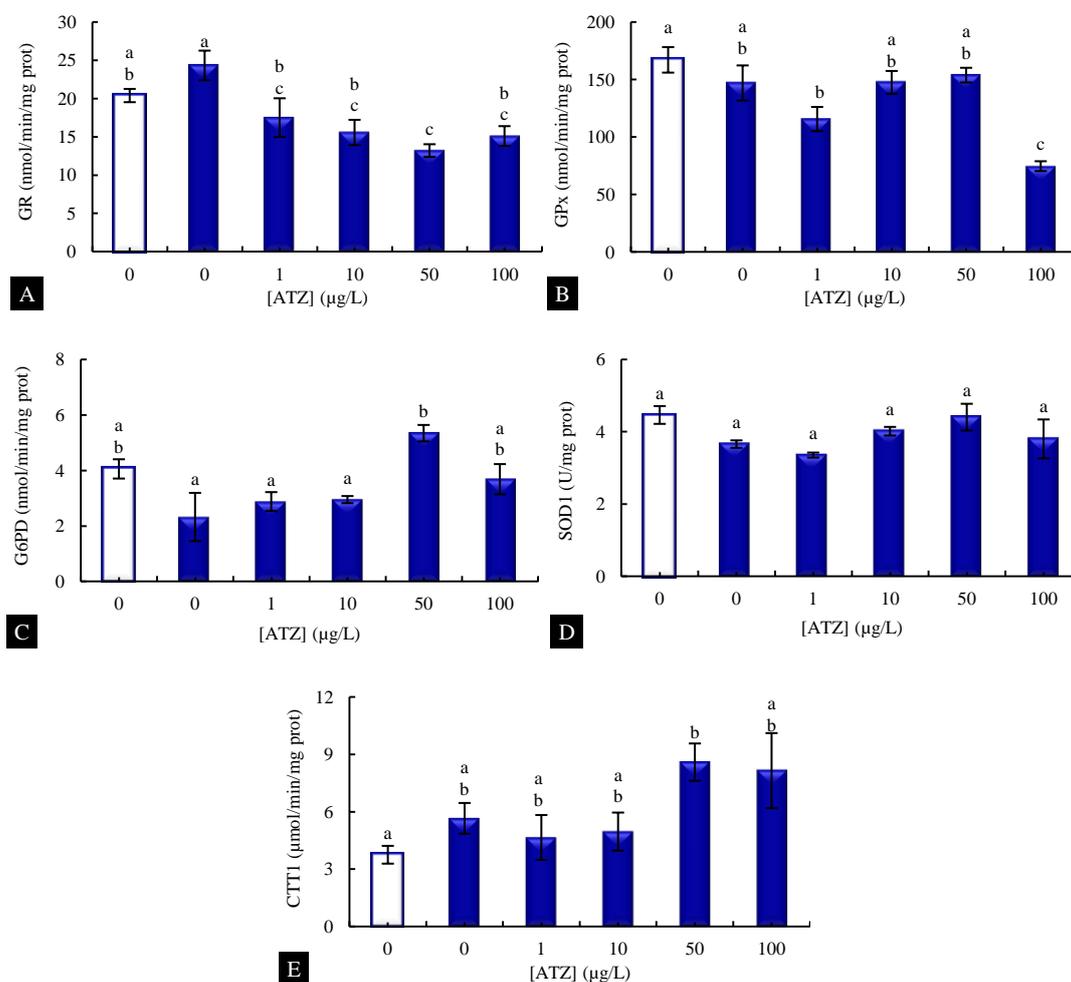


Figura 3.21 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III, no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 µg/L) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 8# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-c) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

As atividades SOD1 e CTT1 de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima (Figura 3.21D e E) não sofreram qualquer alteração com significado estatístico nos animais que contataram com a atrazina (1-10 µg/L) em ambiente dulçaquícola ($p < 0,05$), facto eventualmente justificado por não se terem detetado alterações nos níveis de ROS hepático. Os valores de atividade CTT1 encontram-se próximos dos descritos pela literatura para *Astyanax altiparanae* embora o aumento de atividade CTT1 detetado nesse ser vivo para concentração crescente de ATZ seja distinto do que foi aqui observado em juvenis de lampreia-marinha (194).

Mitocôndrio

A Figura 3.22A-D mostra que o cativo e a exposição à atrazina não provocaram alterações significativas no conteúdo em GSH, GSSG, tióis totais não proteicos e razão GSH/GSSG de mitocôndrios de juvenis de lampreia-marinha ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem que o contacto com a atrazina em ambiente dulçaquícola não afetou a capacidade redox mitocondrial modulada pelo glutatono. Contudo, a Figura 3.22E revela que os níveis de ROS mitocondriais dos efetivos expostos à atrazina (1 e 50 $\mu\text{g/L}$) eram superiores aos do controlo do ensaio. O aumento do conteúdo em ROS parece, ter contribuído para os níveis elevados de MDA mitocondriais (Figura 3.22F), dos juvenis expostos à atrazina (50 $\mu\text{g/L}$) em água doce. Neste caso, a ocorrência de danos oxidativos mitocondriais pode estar relacionada com o aumento dos níveis de ROS, sobre as quais o tripéptido e a atividade GPx mitocondrial (Figura 3.23A) não exerceram ação preventiva.

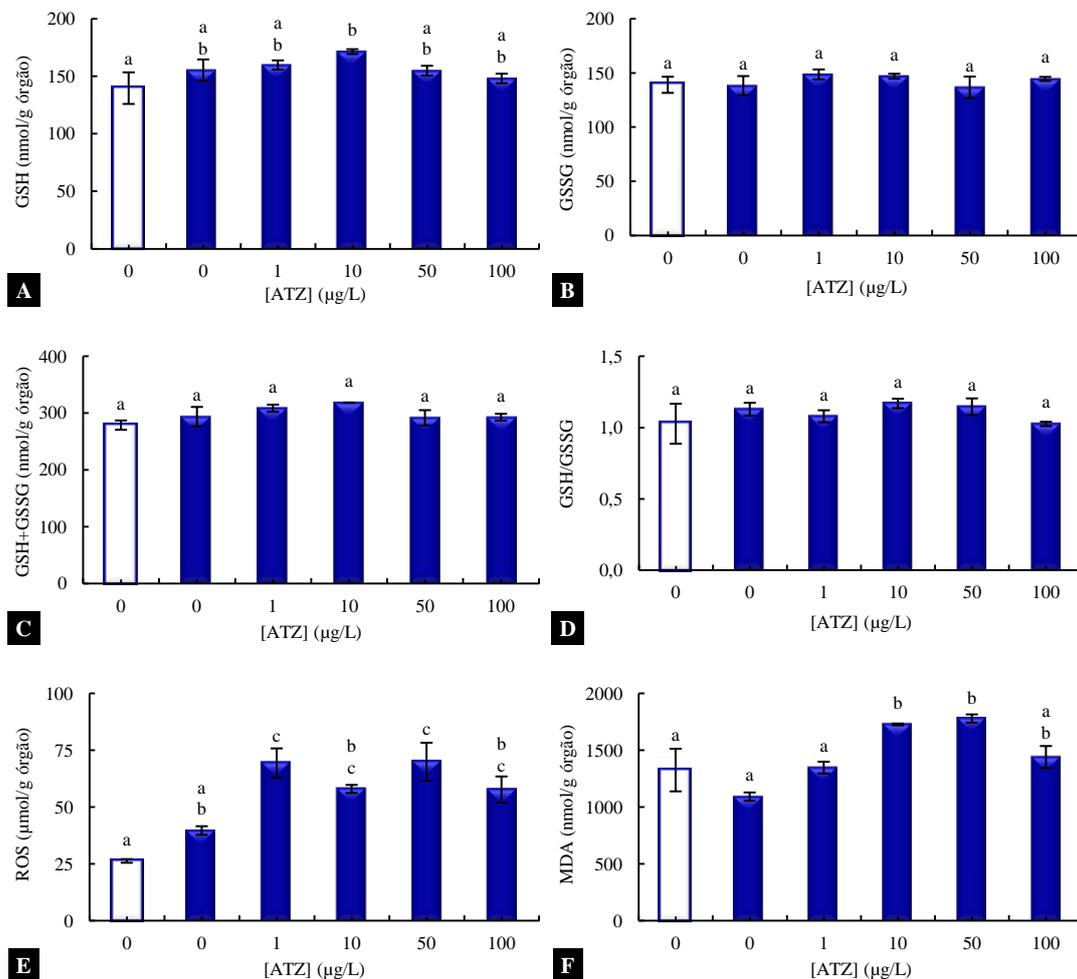


Figura 3.22 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do mitocôndrio hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio, III no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 $\mu\text{g/L}$) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-c) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A atividade SOD2 (Figura 3.23B) sofreu um aumento significativo nos mitocôndrios de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima expostos a atrazina (1 µg/L). Esse aumento poderá ter evitado a acumulação de danos oxidativos no mitocôndrio, apesar dos níveis de ROS elevados que foram detetados no organelo. Convém ainda referir que no tecido hepático de *transformers*, o nível de MDA do citoplasma hepático de juvenis de lampreia-marinha em ambiente dulçaquícola, era muito inferior (3%) ao do mitocôndrio (Figura 3.22F). A referida disparidade de conteúdos, poderá ser devida à ativação inicial do metabolismo respiratório hepático e aos níveis baixos de atividade GPx mitocondrial, inferior (10x) aos detetados no citoplasma. Assim, a exposição à atrazina poderá ter comprometido o metabolismo energético hepático de juvenis de lampreia-marinha, ao provocar danos oxidativos ao nível de membrana interna mitocondrial.

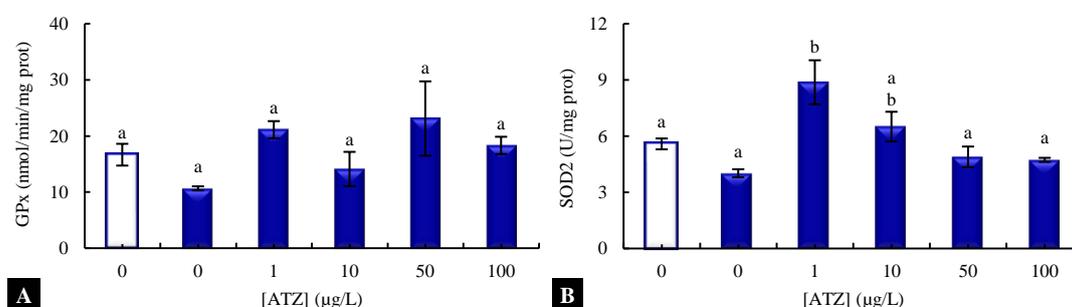


Figura 3.23 - Atividades enzimáticas GPx (A) e SOD2 (B) do mitocôndrio hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III, no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 µg/L) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 8# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

3.3.3.2. Tecido branquial

Citoplasma

As brânquias, primeira linha de contacto das espécies piscícolas com xenobióticos, constituem o local preferencial para serem despoletados mecanismos de resposta ao *stress* que compensem os efeitos desses agentes exógenos ou dos seus produtos da sua degradação, eliminando-os sem prejudicar tecidos mais internos (79,99).

A Figura 3.24 resume a influência da atrazina sobre as reservas em tióis não-proteicos do tecido branquial, bem como sobre a capacidade antioxidante por eles exercidas no sentido de assegurar o saudável ambiente redutor da célula. O conteúdo em GSH, GSSG e tióis totais não-proteicos determinados no tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia

Lima eram próximos dos encontrados na literatura para outra espécie piscícola, como juvenis de *Leporinus elongatus* (314), ou em espécies de lagostins (315).

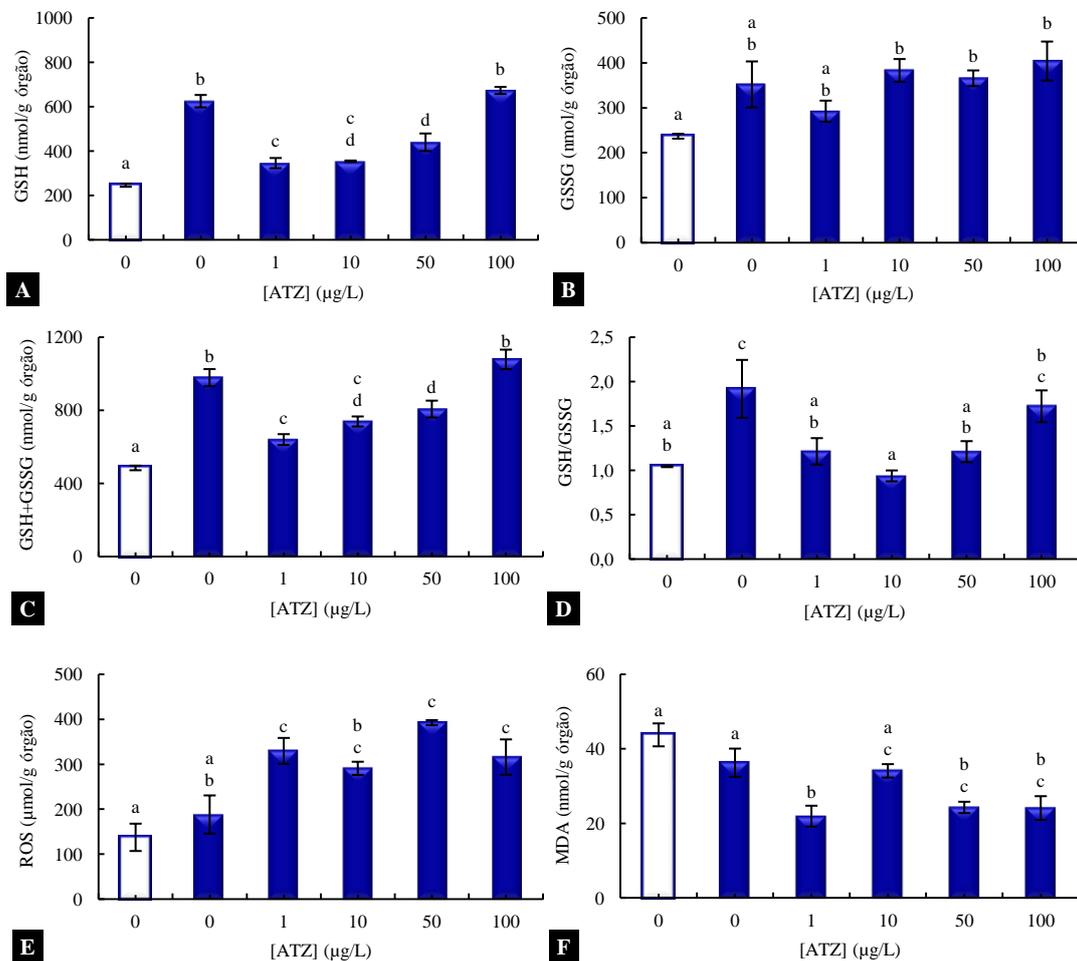


Figura 3.24 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol branquial de juvenis de lamproia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III, no grupo controle à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 µg/L) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 pools de 3# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-d) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A Figura 3.24A revela que o conteúdo em GSH aumentou significativamente com o cativo ($p < 0,05$). No entanto, essa resposta foi atenuada nos juvenis tratados com atrazina 1, 10 e 50 µg/L, embora para o nível de exposição mais elevado já não tenham sido detetadas diferenças significativas do controle de ensaio ($p < 0,05$). Contudo, o conteúdo em GSSG branquial citoplasmático de juvenis de lamproia-marinha da bacia do Lima (Figura 3.24B), o produto de oxidação do tripéptido GSH, não foi afetado quer pelo cativo, quer pela exposição à atrazina ($p < 0,05$).

O conteúdo em tióis totais não-proteicos (Figura 3.24C) e a razão GSH/GSSG citoplasmáticos (Figura 3.24D) exibem um perfil de resposta ao cativo e à exposição à

atrazina sobreponível com o determinado para o GSH. Consequentemente, as reservas de enxofre não proteico e o ambiente redutor citoplasmático modulado pelo GSH parecem ter sido afetados pelo contacto com a atrazina (1, 10 e 50 µg/L), contrariando a resposta ao cativo.

Surpreendentemente, a Figura 3.24E revela que a quantidade de ROS branquial citoplasmático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima não foi afetada pelo cativo em ambiente dulçaquícola, mas aumentou significativamente devido à exposição à atrazina, exceto para a concentração de 10 µg/L. No entanto, os níveis de danos celulares citoplasmáticos resultantes da peroxidação lipídica e inferidos pela concentração de MDA (Figura 3.24F) diminuíram significativamente em todos os grupos de juvenis de lampreia-marinha tratados com o produto fitofarmacêutico, exceto nos efetivos expostos à atrazina (10 µg/L) que possuíam um conteúdo do dialdeído idêntico ao de qualquer dos controlos, valores inferiores aos descritos pela literatura ($p < 0,05$) (314).

A Figura 3.25 ilustra a resposta à atrazina por enzimas antioxidantes do tecido branquial. A Figura 3.25A e D revelam que o contacto de juvenis de lampreia-marinha com qualquer dos níveis de exposição à atrazina não produziu alterações significativas nas atividades enzimáticas GR e SOD1 branquiais ($p < 0,05$). A partir da Figura 3.25B pode-se também constatar que a atividade GPx de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima aumentou significativamente com o cativo em ambiente dulçaquícola, efeito que foi revertido pela exposição à atrazina (1, 50 e 100 µg/L) ($p < 0,05$).

Os níveis de atividade G6PD do citoplasma branquial detetados nos efetivos da bacia do Lima eram inferiores aos encontrados na literatura (169). Apesar de o cativo em água doce não ter perturbado a atividade G6PD dos efetivos da referida bacia, a exposição dos animais à atrazina (50 e 100 µg/L) provocou um decréscimo da dita atividade enzimática. Esta resposta poderá ter atenuado a regeneração de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao funcionamento do ciclo do glutatono, minimizando a resposta antioxidante do tripéptido (Figura 3.25C). A atividade G6PD candidata-se assim a biomarcador de contacto com a atrazina em ambiente dulçaquícola para níveis superiores a 50 µg/L.

A Figura 3.25E revela que os níveis de atividade CTT1 branquiais de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, eram muito inferiores aos encontrados na literatura (194,313), e correspondiam aproximadamente a 1/7 dos valores detetados no tecido hepático (Figura 3.21E). Por outro lado, a atividade catalítica destas hemoproteínas aumentou nos efetivos expostos a atrazina 1, 50 e 100 µg/L ($p < 0,05$). Estes resultados evidenciam uma

resposta complementar à que foi previamente descrita para o enzima GPx, sugerindo a triazina poderá ter despoletado um mecanismo citoplasmático de proteção contra a peroxidação lipídica branquial, alternativo ao ciclo de oxidação-redução do glutatono.

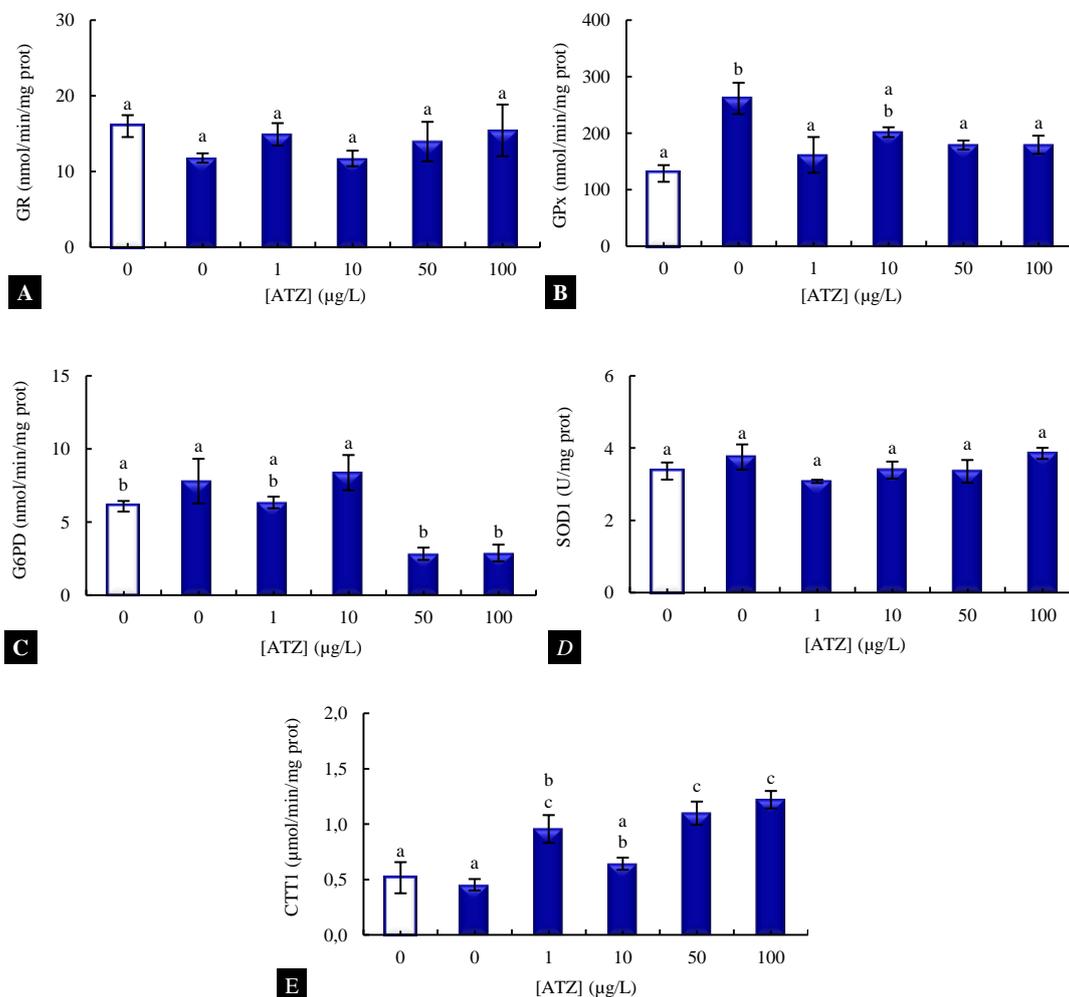


Figura 3.25 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio III no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 µg/L) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 3# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-c) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A elevação dos níveis de ROS branquial citoplasmático, após exposição à atrazina (50 e 100 µg/L) em água doce, poderá ser devida a perda de capacidade para desintoxicar peróxidos e lipoperóxidos via GPx, bem como de regenerar equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao adequado funcionamento do ciclo do glutatono no citoplasma. A indução pelo contacto com a atrazina (50 e 100 µg/L) da atividade CTT1, terá sido insuficiente para consumir o excesso de ROS acumulado pela atenuação do ciclo do glutatono, devido ao nível branquial da referida atividade enzimática ser muito inferior ao do

tecido hepático. Surpreendentemente, células branquiais expostas ao produto fitofarmacêutico, não exibiram níveis de MDA citoplasmáticos elevados. Na maior parte dos casos, os níveis deste dialdeído eram inferiores ao dos controlos, o que permite inferir que os níveis elevados de ROS não foram capazes de provocar danos oxidativos adicionais, um aspeto que deverá ser aprofundado em estudos futuros.

Mitocôndrio

A Figura 3.26A-D, revela que o cativo e a exposição à atrazina (1-100 $\mu\text{g/L}$) não afetaram significativamente o conteúdo em GSH, GSSG, tióis totais não proteicos e razão GSH/GSSG mitocondrial de brânquias de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima. Contudo, o conteúdo em ROS e MDA aumentou com a exposição a atrazina 10 e 100 ($\mu\text{g/L}$) e 10 e 50 ($\mu\text{g/L}$), respetivamente ($p < 0,05$) (Figura 3.26E e F).

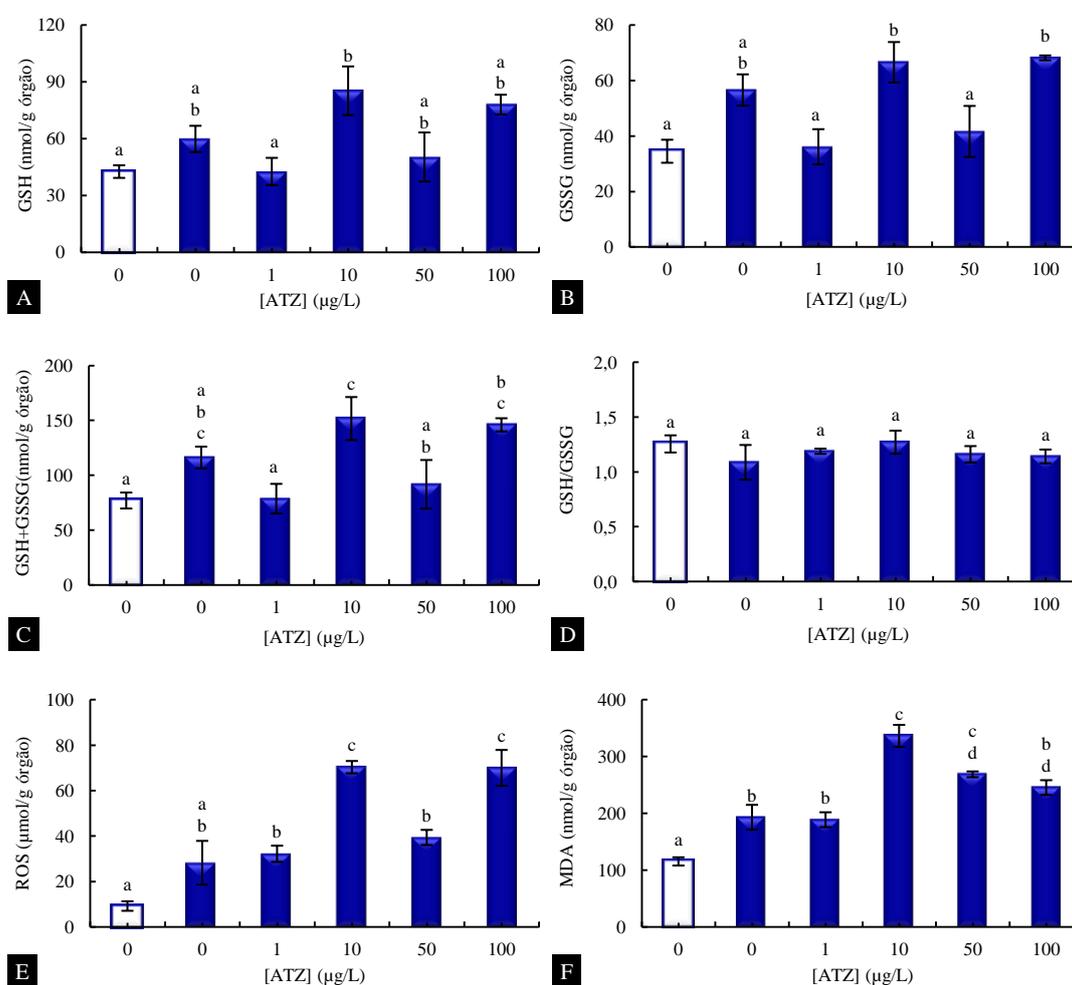


Figura 3.26 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do mitocôndrio branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio III, no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 $\mu\text{g/L}$) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-d) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

Embora a atividade antioxidante GPx mitocondrial, (Figura 3.27A) dos juvenis da bacia do Lima, do controlo à chegada, seja superior à dos outros grupos em análise, não se detetaram diferenças significativas entre os animais que contataram com a atrazina (1-100 $\mu\text{g/L}$) e o grupo controlo de ensaio ($p < 0,05$), resposta distinta da observada no citoplasma branquial que em qualquer dos casos minimizou a proteção adequada contra peróxidos ou lipoperóxidos. A atividade SOD2 branquial de mitocôndrios dos efetivos da bacia do Lima não foi perturbada pelo cativeiro, nem pela exposição a atrazina (1-100 $\mu\text{g/L}$) em ambiente dulçaquícola, perfil de resposta semelhante ao descrito para a SOD1 citoplasmática (Figura 3.27B).

A ausência de resposta das atividades GPx e SOD2 dos mitocôndrios branquiais de juvenis de lampreia-marinha, após exposição à atrazina (1-100 $\mu\text{g/L}$), poderá ter contribuído para incrementar a ocorrência de danos oxidativos no mitocôndrio. Embora o conteúdo em ROS citoplasmático (Figura 3.24E) fosse superior (15x) ao do mitocôndrio (Figuras 3.26E), o elevado conteúdo em tióis totais não proteicos citoplasmático (Figura 3.24C), superior (6 a 7x) ao do mitocôndrio (Figuras 3.26C), bem como da atividade GPx (Figura 3.25B), superior (3x) à mitocondrial (Figura 3.27A), parecem ter evitado de forma mais eficaz a ocorrência de danos oxidativos no citoplasma branquial (Figura 3.24F), que correspondiam a aproximadamente 2/5 dos detetados no mitocôndrio (Figura 3.26F). Provavelmente, dificuldades no transporte do GSH do citoplasma para o mitocôndrio poderão ter contribuído para aumentar a ocorrência de danos oxidativos, nesse organelo das brânquias de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, essencial ao sucesso da migração trófica (44,305,324).

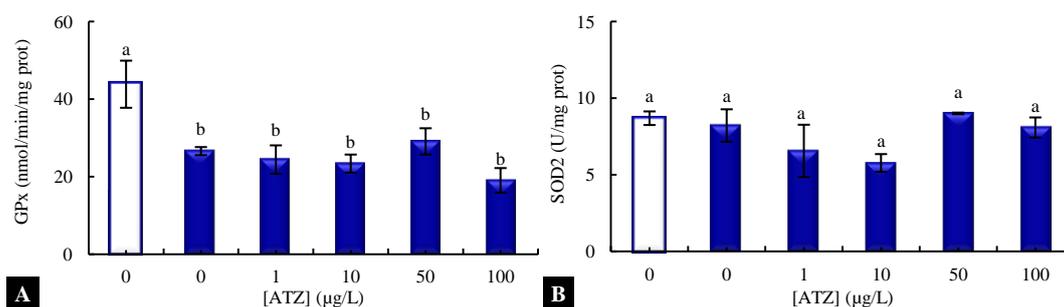


Figura 3.27 - Atividades enzimáticas GPx (A) e SOD2 (B) do mitocôndrio branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio III no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (1, 10, 50 ou 100 $\mu\text{g/L}$) em meio dulçaquícola, ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 3 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A continuação deste estudo exigiu a seleção de dois níveis de exposição à atrazina que permitissem avaliar a influência da atrazina sobre parâmetros biométricos, sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* do fígado e brânquias de juvenis de lampreia-marinha, expostos ao gradiente de salinidade 35. Optou-se pela exposição à atrazina (50 e 100 µg/L), por serem os que mais afetaram os parâmetros analisados em ambiente dulçaquícola, particularmente os juvenis da bacia do Lima que contataram com a atrazina (50 µg/L).

3.4. Caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV)

Os resultados descritos neste sub-capítulo (Ensaio IV) possibilitaram avaliar como a exposição à atrazina 50 e 100 µg/L influenciou a resposta de macroftalmias ao gradiente de salinidade 35. Neste ensaio, juvenis de lampreia-marinha provenientes da bacia do Lima foram homogeneamente distribuídos por 4 grupos de tratamentos distintos, conforme previamente descrito no sub-capítulo 2.3. e designados por: “controlo à chegada”, “controlo do ensaio”, “exposto à atrazina 50 µg/L em meio salino” e “exposto à atrazina 100 µg/L em meio salino”.

A caracterização morfométrica e bioquímica aqui descrita inclui a determinação de parâmetros idênticos aos que foram analisados no Ensaio III em cada grupo de animais.

3.4.1. Biometria

O Quadro 3.4 mostra que o TL (140 – 142 mm), o TW (4,33 – 4,53 g), o LW (0,0333 – 0,0369 g) e o parâmetro HSI (0,74 – 0,86) de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima são próximos dos valores encontrados na literatura (10,15,49,304). O referido quadro mostra ainda que as condições de gradiente salinidade ou de exposição à atrazina (50 ou 100 µg/L) em gradiente salinidade, não contribuíram para induzir alterações com significado estatístico dos referidos parâmetros, com exceção do índice HSI que diminui com a exposição à atrazina (50 ou 100 µg/L) ($p < 0,05$).

Aparentemente, a aclimação ao sal em gradiente de salinidade poderá ter prevenido a perda de peso do tecido hepático despoletado pela exposição à atrazina 100µg/L. No entanto o decréscimo do índice hepato-somático detetado nos efetivos expostos à atrazina (50 e 100 µg/L), em gradiente de salinidade 35, indicia manifestação de toxicidade hepática, efeito igualmente detetado em juvenis expostos à atrazina (100 µg/L) em água doce.

O GW (0,051 - 0,066 g) e o índice GLSI (1,163 - 1,390%) de juvenis de lampreia-marinha diminuíram após exposição à atrazina (50 µg/L) em gradiente de salinidade (Quadro 3.4) ($p < 0,05$) não tendo sido detetadas diferenças significativas entre os restantes grupos de animais analisados neste ensaio, resposta que não foi observada nos efetivos de água doce.

Quadro 3.4 –Parâmetros morfométricos de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio IV no grupo controlo à chegada (Grupo 1), controlo do ensaio (Grupo 2), exposto atrazina 50µg/L (Grupo 3), exposto atrazina 100µg/L (Grupo 4). Os resultados representam a média de 40 animais em cada grupo \pm erro padrão da média. As médias de uma mesma coluna assinaladas com letras diferentes (a-d) são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

Bacia	Grupo	S	ATZ	TL (mm)	TW (g)	LW (g)	HSI (%)	GW (g)	GSI (%)	K
Lima	1	0	0	141 \pm 1,6 ^a	4,53 \pm 0,11 ^a	0,0333 \pm 0,0010 ^a	0,74 \pm 0,02 ^a	0,0586 \pm 0,0029 ^{ab}	1,30 \pm 0,06 ^{ab}	0,32 \pm 0,00 ^a
	2	35	0	142 \pm 1,3 ^a	4,33 \pm 0,11 ^a	0,0369 \pm 0,0012 ^a	0,86 \pm 0,02 ^b	0,0597 \pm 0,0022 ^a	1,39 \pm 0,05 ^{ac}	0,30 \pm 0,01 ^{bcd}
	3	35	50	140 \pm 1,3 ^a	4,47 \pm 0,17 ^a	0,0346 \pm 0,0017 ^a	0,78 \pm 0,03 ^{ac}	0,0512 \pm 0,0034 ^b	1,16 \pm 0,07 ^b	0,31 \pm 0,01 ^{ac}
	4	35	100	141 \pm 1,1 ^a	4,27 \pm 0,10 ^a	0,0361 \pm 0,0010 ^a	0,75 \pm 0,02 ^{ac}	0,0661 \pm 0,0025 ^a	1,55 \pm 0,04 ^c	0,30 \pm 0,00 ^{acd}

Salinidade (S), concentração de atrazina em µg/L (ATZ), salinidade (S), comprimento corporal (TL), peso corporal (TW), peso do fígado (LW), índice hepato-somático (HSI), peso das brânquias (GW), índice branquio-somático (GLSI) e fator de condição de Fulton (K).

O fator de condição de Fulton K (0,297 - 0,320) assumiu neste ensaio valores próximos dos descritos pela bibliografia consultada (15,270) (Quadro 3.4). A partir do referido quadro pode-se ainda constatar que apenas os juvenis de lampreia-marinha do controlo de ensaio de exposição ao gradiente salinidade, apresentou um fator K significativamente inferior ao calculado para os animais do controlo à chegada, mas idêntico ao de macrofthalmias expostas à atrazina em gradiente de salinidade, alteração pontual que não repete o observado no Ensaio III (Quadro 3.3).

3.4.2. Biotransformação

Este texto dedica-se à caracterização da resposta à atrazina, em termos de biotransformação, por juvenis de lampreia-marinha, durante a adaptação ao gradiente de salinidade 35, uma vez que a literatura assume em diversas situações experimentais que a salinidade condiciona o efeito dos xenobióticos em espécies piscícolas (38,45,46).

3.4.2.1. Tecido hepático

O cativo e a exposição à atrazina (50 ou 100 µg/L) em gradiente de salinidade 35 não provocaram alterações significativas no conteúdo em hemo, nem nas atividades enzimáticas ALP, CPR e ECOD do tecido hepático de lampreia-marinha (Figura 3.28), apresentando valores próximos dos encontrados na literatura consultada (310).

O cativo em gradiente de salinidade 35 provocou um aumento significativo das atividades mGST e cGST (Figura 3.29B e D), comparativamente com as detetadas à chegada, exibindo valores superiores aos encontrados na literatura (311,313). Todavia, a presença de atrazina (50 µg/L) reverteu o aumento da atividade mGST (Figura 3.29B) ($p < 0,05$).

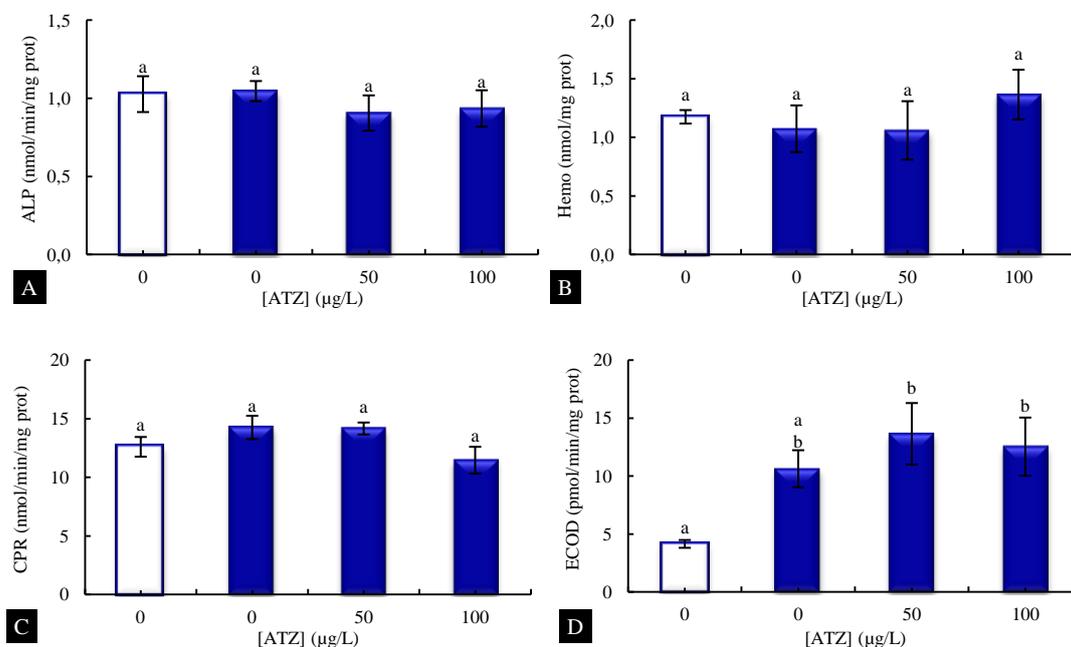


Figura 3.28 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol, conteúdo em hemo (B) e atividades enzimáticas CPR (C) e ECOD (D) da fração microsomal hepática de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio IV no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 pools de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$)

A atividade UDPGT (Figura 3.29A) de *transformers*, expostos a atrazina (50 µg/L), em gradiente de salinidade 35, duplicou em relação a qualquer dos grupos analisados neste ensaio ($p < 0,05$).

As alterações descritas para as atividades CPR, mGST e cGST dos animais expostos à atrazina (50 ou 100 µg/L) (Figuras 3.16C e 3.17B e C), em ambiente dulçaquícola, deixaram de se observar nos efetivos que estiveram sujeitos ao gradiente de salinidade 35 (Figuras 3.28C e 3.29B e C) ($p < 0,05$). Convém, também destacar que os animais do grupo controlo à chegada, exibiam atividades de biotransformação diferentes das que foram registados no estudo com a atrazina em ambiente dulçaquícola, nomeadamente as atividades ECOD e cGST (Figuras 3.28D e 3.29C) que, neste ensaio, correspondiam, à chegada, a 1/6 e 1/5, respetivamente das atividades ECOD e cGST dos controlos à chegada do Ensaio III (Figura 3.16D e 3.17C) o qual decorreu em ambiente dulçaquícola. No entanto, as atividades microsomais da segunda fase de biotransformação, UDPGT e mGST (Figuras 3.29A e B),

determinadas neste ensaio, eram, mais elevadas (3x e 31x) do que as detetadas no controlo à chegada do Ensaio III.

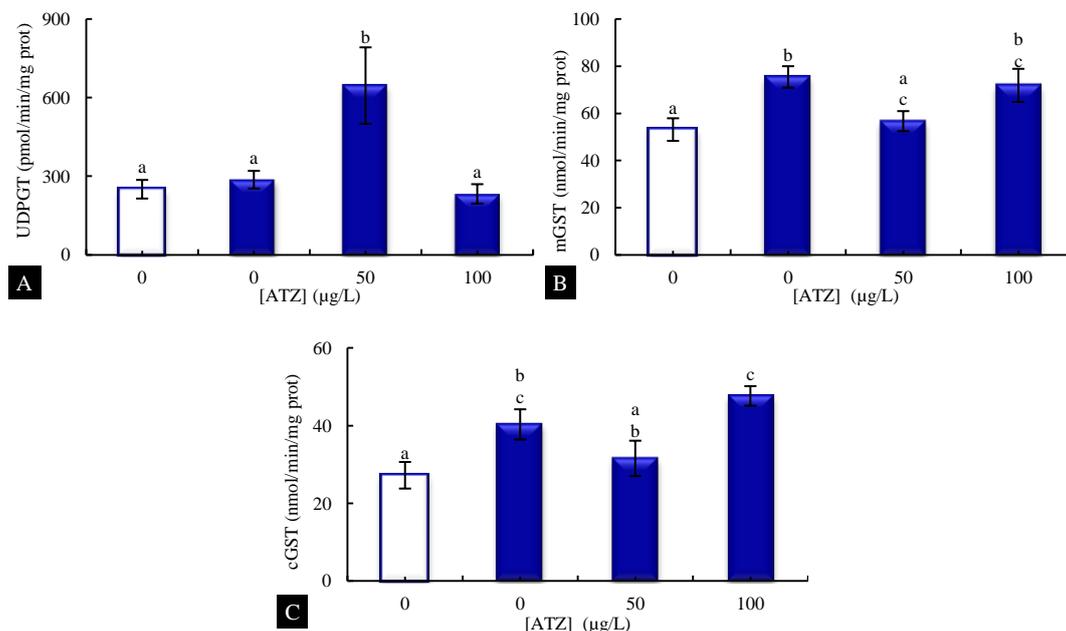


Figura 3.29 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do Lima do Ensaio IV no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 pools de 8# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan (p < 0,05).

Os resultados descritos no parágrafo anterior sugerem que os efetivos capturados no final de 2012 terão estado sujeitos a uma pressão ambiental distinta dos que foram capturados entre o final de 2011 e o início de 2012, pelo que pode-se assumir que os parâmetros de biotransformação hepáticos, aqui analisados, estimam populações de juvenis de lampreia-marinha distintas em cada ano de ensaio.

3.4.2.2. Tecido branquial

A Figura 3.30 mostra que a exposição à atrazina (100 µg/L) em gradiente de salinidade 35 provocou um aumento significativo da atividade ALP de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima que não diferia significativamente dos valores determinados nas brânquias dos efetivos tratados com atrazina (50 µg/L), nem do controlo à chegada (p < 0,05). Embora, se possa admitir que a exposição ao produto fitofarmacêutico promoveu a disponibilização intracelular de grupos fosfato no tecido branquial, tal interpretação poderá ser um pouco abusiva, uma vez que os valores registados nos efetivos expostos a atrazina (100 µg/L) eram estatisticamente idênticos aos detetados no controlo à chegada.

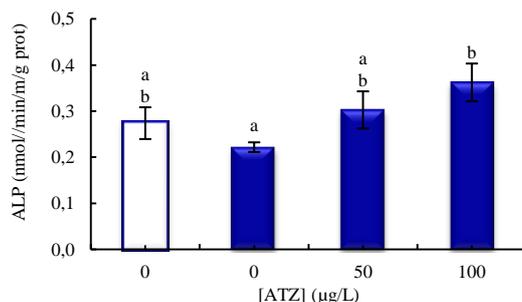


Figura 3.30 - Atividade enzimática ALP (A) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio IV no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 pools de 3# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

O contacto dos *transformers* da bacia do Lima com a atrazina (50 e 100 µg/L) provocou um decréscimo significativo da atividade UDPGT (Figura 3.31A), para níveis inferiores (3x) aos de qualquer grupo controlo ($p < 0,05$). Um bloqueio tão pronunciado de reações de conjugação deste tipo pode ter contribuído para a acumulação da triazina no tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha. O enzima UDPGT candidata-se assim a biomarcador da exposição branquial à atrazina em gradiente de salinidade 35.

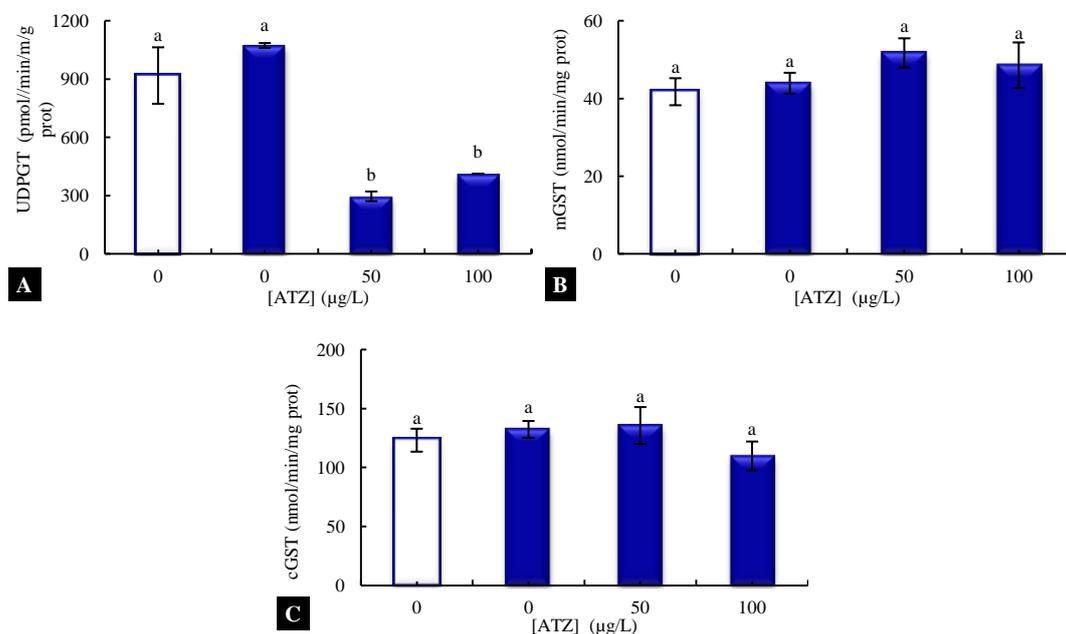


Figura 3.31 - Atividades enzimáticas UDPGT (A), mGST (B) da fração microsossomal e cGST (C) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio IV no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 pools de 3# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A Figura 3.31B e C, para além de representar valores superiores aos encontrados na literatura (311,313), mostra que o contacto com a atrazina (50, 100 µg/L), a salinidade 35 não provocou alterações significativas nas atividades enzimáticas mGST e cGST do tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima ($p < 0,05$). Contudo, o perfil de resposta à triazina, em termos de atividade cGST foi distinto do detetado no Ensaio III (Figura 3.19B e C). No entanto, as atividades mGST e cGST dos efetivos do grupo controlo à chegada (Figuras 3.31B e C), eram superiores aos determinados nos mesmos grupos, em ambiente dulçaquícola. Pode-se assim admitir que os efetivos analisados neste ensaio se encontravam metabolicamente mais estimulados contra a atrazina.

3.4.3. *Stress* oxidativo e defesas antioxidantes

Neste texto, procura-se avaliar e caracterizar a resposta de marcadores de *stress* oxidativo e de danos celulares ao contacto com a atrazina, em gradiente de salinidade 35. Mais uma vez, convém referir que muitas das alterações observadas para a exposição a xenobióticos em ambiente dulçaquícola podem ser parcial ou totalmente revertidas se acontecerem em gradiente de salinidade (99).

3.4.3.1. Tecido hepático

Citoplasma

As Figuras 3.32A-E e 3.33A-D revelam que o ambiente redutor celular hepático modulado pelo glutatono em juvenis de lampreia-marinha, expresso em termos de conteúdo em GSH, GSSG, tióis totais não-proteicos, razão GSH/GSSG e níveis de ROS, bem como nas atividades enzimáticas GR, GPx, G6PD e SOD1, não sofreram alterações significativas com a exposição à atrazina (50, 100 µg/L), em gradiente de salinidade 35 ($p < 0,05$), tendo alcançado valores próximos dos encontrados na literatura (29, 30, 32, 33). Este perfil diverge do que foi observado em ambiente dulçaquícola (Ensaio III) nos animais expostos a atrazina (100 µg/L), relativamente ao conteúdo em GSH, tióis totais não-proteicos e atividades GR e GPx, bem como à atividade GR nos animais expostos à atrazina 50 µg/L (Figuras 3.20A e C, 3.21A e B). No entanto, observou-se um decréscimo significativo dos níveis de MDA (Figura 3.32F), em *transformers* mantidos em cativeiro, efeito que foi acentuado nos animais que contataram com atrazina (50 µg/L), mas que contraria o que foi detetado em ambiente dulçaquícola (Ensaio III) (Figura 3.20F). Além disso, a atividade CTT1 (Figura 3.33E), cujos valores eram muito inferiores aos descritos pela literatura (194,313), diminuiu

significativamente no tecido hepático de qualquer dos grupos de juvenis tratados com atrazina ($p < 0,05$), uma resposta igualmente distinta da descrita no Ensaio III (Figura 3.21E). Convém também referir que o conteúdo em GSSG (Figuras 3.32A) e as atividades enzimáticas GR e G6PD (Figura 3.33A e B) citoplasmáticos, registados à chegada neste ensaio, correspondiam a metade, um quarto e um terço, respetivamente, dos valores determinados para os mesmos grupos no Ensaio III (Figuras 3.20A e 3.21A e C). Observou-se ainda que o conteúdo em ROS e MDA (Figura 3.32 E e F) dos animais controlo à chegada, utilizados neste ensaio eram superiores (9x e 5x), respetivamente, aos determinados nos mesmos controlos do Ensaio III (Figura 3.20E e F). A divergência registada entre os resultados obtidos com os grupos controlo à chegada de cada ensaio, apontam para a diferente pressão ambiental exercida, em cada ano, pelo habitat no período que precedeu a sua captura.

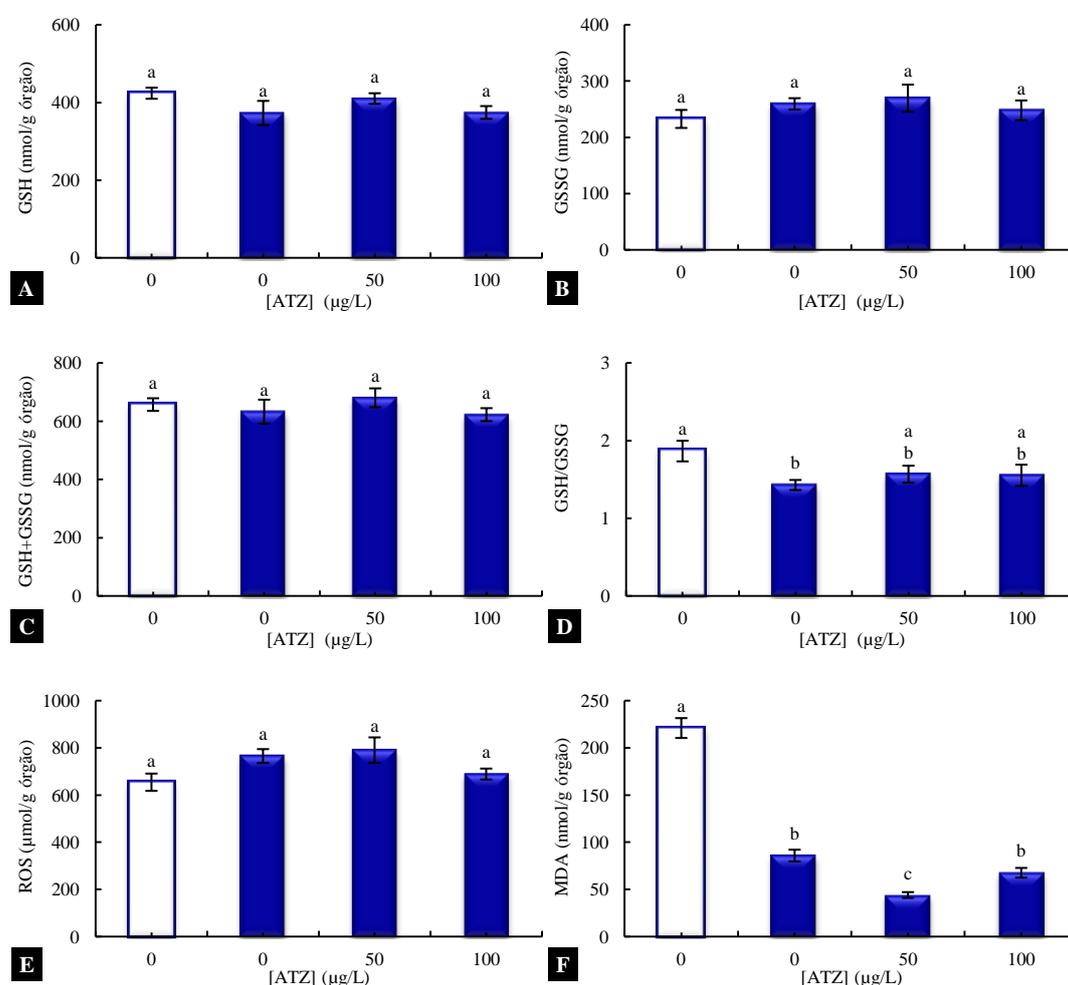


Figura 3.32 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV, no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 pools de 8# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

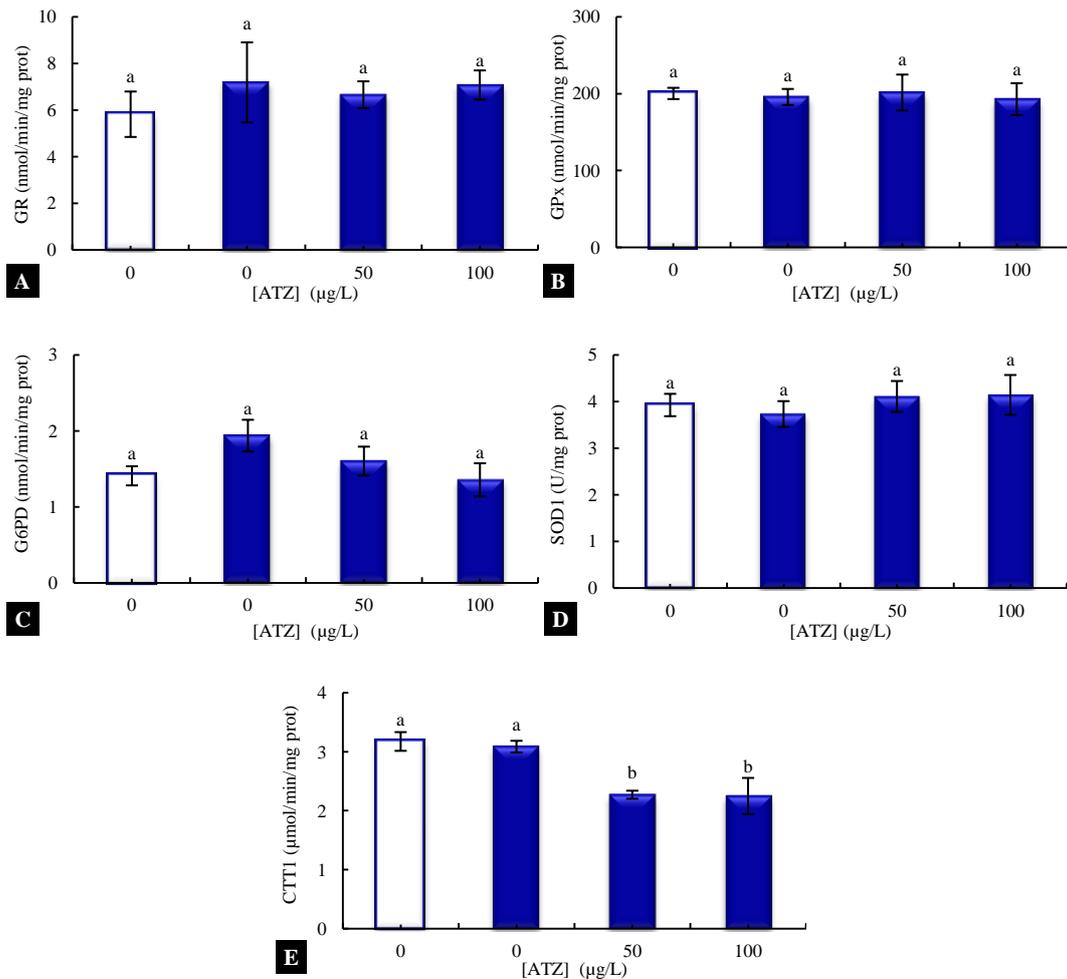


Figura 3.33 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) do citosol hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio IV no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

Mitocôndrio

As Figuras 3.34A,C-E e 3.35A e B revelam que a exposição de macroftalmias a atrazina (50 e 100 µg/L) não causou alterações significativas no conteúdo mitocondrial hepático em GSH, tióis totais não-proteicos, razão GSH/GSSG e ROS, bem como nas atividades mitocondriais GPx e SOD2. Contudo, detetou-se um aumento significativo do conteúdo em GSSG, nos animais expostos a atrazina (50 µg/L) e do conteúdo em MDA nos efetivos expostos a atrazina (50 e 100 µg/L) ($p < 0,05$) (Figura 3.34B e F).

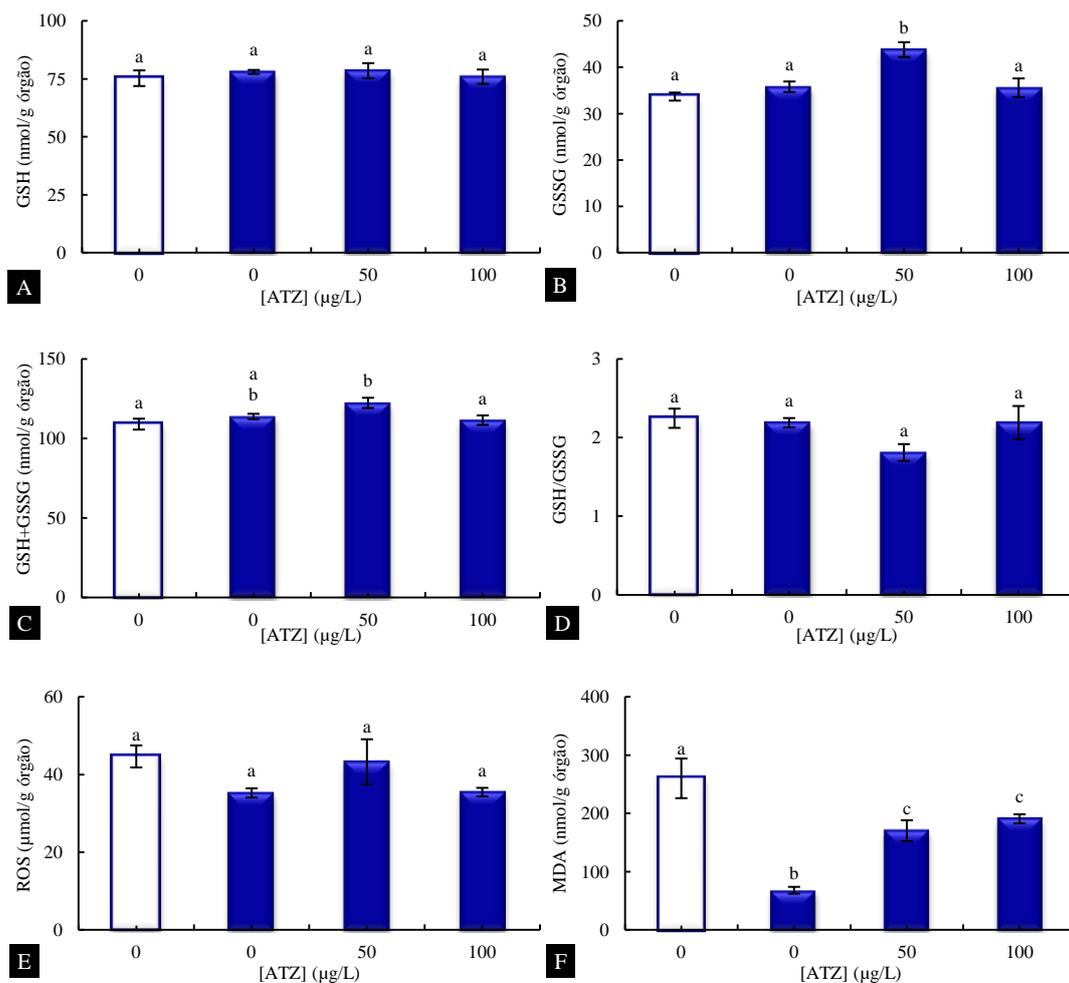


Figura 3.34 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do mitocôndrio hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV, no grupo controle à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan (p < 0,05).

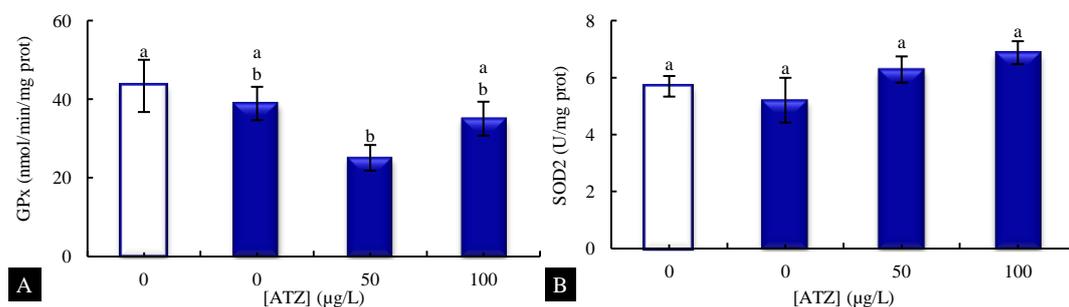


Figura 3.35 - Atividades enzimáticas GPx (A) e SOD2 (B) do mitocôndrio hepático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do, Ensaio IV, no grupo controle à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 8# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan (p < 0,05).

Apesar do conteúdo em ROS citoplasmático hepático, dos juvenis do grupo controlo à chegada (Figura 3.32E), ser superior (15x) ao determinado na fração mitocondrial (Figura 3.34E), a razão GSH/GSSG (Figuras 3.32D e 3.34D), bem como os níveis de MDA citoplasmáticos (Figura 3.32F) diminuíram ou não se alteraram com a exposição à triazina, enquanto o conteúdo em MDA mitocondrial (Figura 3.34F) aumentou ($p < 0,05$). Este tipo de resposta dever-se-á, provavelmente, à capacidade tampão redox do glutatióno, uma vez que no citoplasma hepático ocorreram níveis mais elevados do conteúdo em tióis totais não-proteicos (6x) (Figura 3.32C e 3.34C) e de atividade da GPx (5x) (Figuras 3.33B e 3.35A).

3.4.3.2. Tecido branquial

Citoplasma

O conteúdo em GSH, tióis totais não-proteicos, razão GSH/GSSG e ROS (Figura 3.36 A, C, D e E), bem como as atividades enzimáticas antioxidantes GR, SOD1 e CTT1 do citoplasma branquial (Figura 3.37A, D e E) não sofreram alterações significativas com o cativo (p < 0,05).

O conteúdo em GSH, tióis totais não-proteicos e razão GSH/GSSG (Figura 3.36 A, C e D), bem como as atividades enzimáticas antioxidantes GR, GPx e SOD1 do citoplasma branquial (Figura 3.37A, B e D) que assumiram valores idênticos aos da literatura (314,315), não foram afetados pela exposição à atrazina, em gradiente de salinidade 35 ($p < 0,05$), resposta divergente da que foi detetada em meio dulçaquícola, onde os juvenis de lampreia-marinha expostos a atrazina (50 µg/L), exibiram um decréscimo do conteúdo em GSH, tióis totais não-proteicos e da razão GSH/GSSG, bem como da atividade GPx, extensível aos efetivos expostos a atrazina (100 µg/L).

A Figura 3.36B revela também que o conteúdo em GSSG do citoplasma branquial de macroftalmias do Lima, pertencentes ao controlo de ensaio, era superior ao controlo à chegada e foi superado nos efetivos, expostos a atrazina (50 µg/L) em gradiente de salinidade 35 ($p < 0,05$).

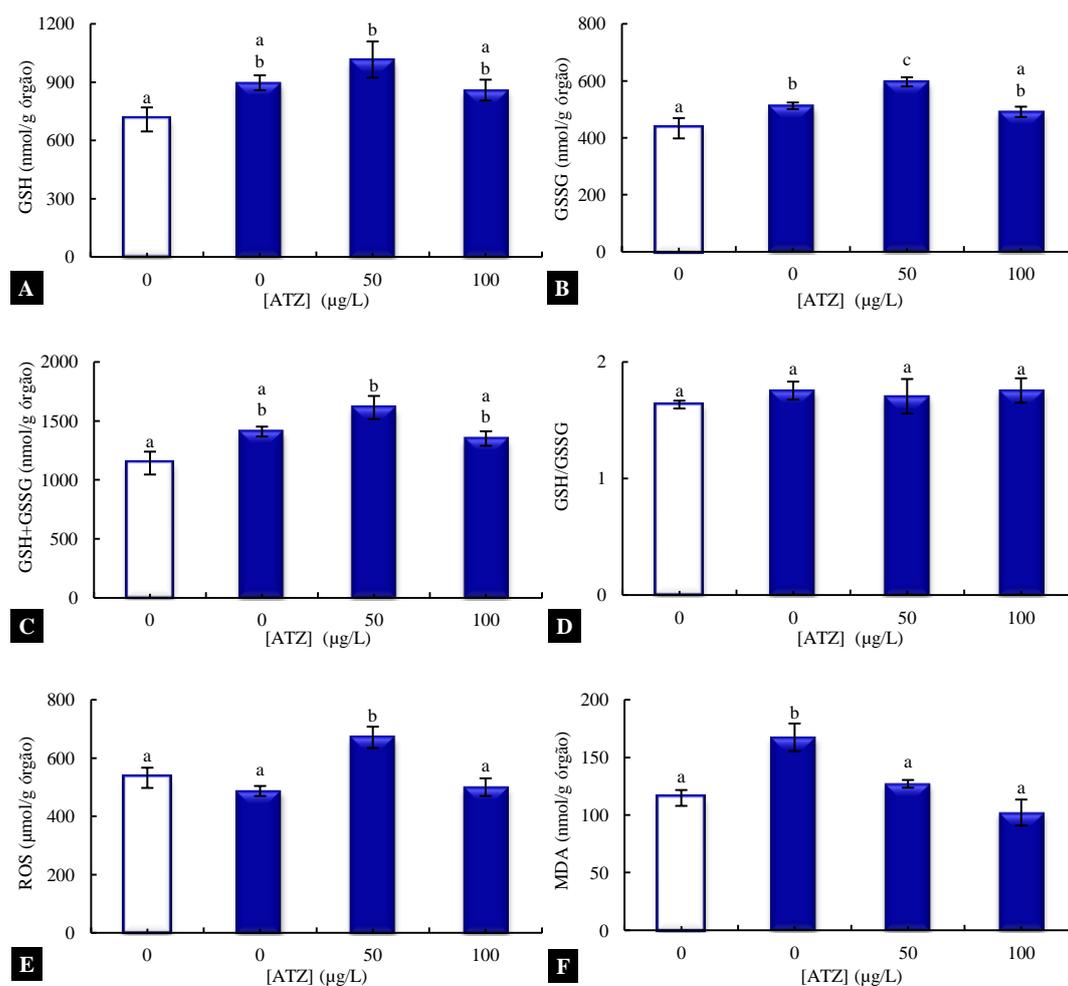


Figura 3.36 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, do Ensaio IV, no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A partir da Figura 3.36E pode-se constatar que o conteúdo branquial em ROS do citoplasma de *transformers* tratados com atrazina (50 µg/L) era superior ao determinado em qualquer dos controlos que não diferiam entre si, e ao estimado em juvenis expostos a atrazina (100 µg/L) ($p < 0,05$).

A exposição à atrazina (50 e 100 µg/L) (Figura 3.36F) provocou um decréscimo significativo do conteúdo em MDA do citoplasma branquial ($p < 0,05$), perfil de resposta parcialmente idêntico ao observado no Ensaio III, onde este marcador de danos celulares diminuiu face aos controlos à chegada e de ensaio.

A atividade G6PD de macroftalmias da bacia do Lima apresentou-se inferior à avaliada na fração pós-mitocondrial do tecido branquial da espécie piscícola *Wallago attu* (169). A referida figura revela também que o cativo em gradiente de salinidade 35 provocou um aumento da atividade G6PD ($p < 0,05$). A Figura 3.37C mostra ainda que a

atividade G6PD diminuiu nos juvenis de lampreia-marinha expostos a atrazina (100 $\mu\text{g/L}$) ($p < 0,05$), perfil de resposta que já tinha sido observado em ambiente dulçaquícola nos animais que contactaram com os dois níveis de exposição ao produto fitofarmacêutico (Figura 3.25C). Este perfil de resposta à salinidade que diverge do que foi observado quer no Ensaio I quer no Ensaio II, parece indiciar neste ensaio, uma ativação da via das pentoses fosfato branquial pela salinidade, tendo em vista aumentar a disponibilidade de equivalentes redutores que assistem ao ciclo de oxidação-redução do glutatono. Nessa perspetiva, parece ser um esforço metabólico fútil devido à atividade GR não ter sido afetada e a atividade GPx mostrar-se inferior à do controlo à chegada.

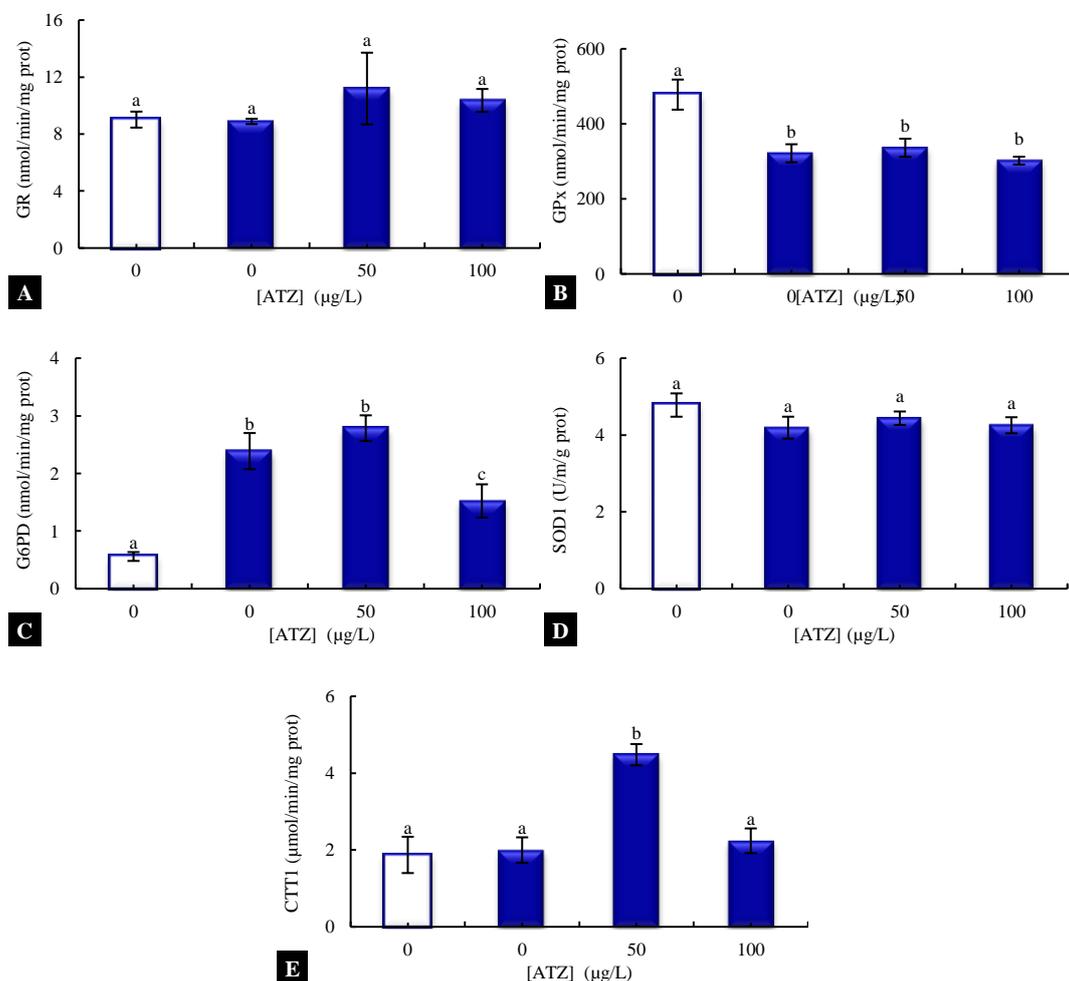


Figura 3.37 - Atividades enzimáticas GR (A), GPx (B), G6PD (C), SOD1 (D) e CTT1 (E) de citosol branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima do Ensaio IV, no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 $\mu\text{g/L}$) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais \pm erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

A atividade enzimática CTT1 apresentou valores próximos dos descritos na literatura consultada (194,313) (Figura 3.37E). A referida atividade catalítica parece ter desempenhado um papel relevante na prevenção de danos celulares pelo peróxido de hidrogénio no tecido branquial dos *transformers* que contactaram com atrazina (50 µg/L), uma vez que ocorreu um aumento significativo da atividade CTT1, nesse grupo de animais ($p < 0,05$). Esta resposta poderá ter contribuído para o decréscimo dos níveis de MDA (Figura 3.36F) já descrito anteriormente.

Convém também referir que se detetaram, nos juvenis de lampreia-marinha do grupo controlo à chegada deste ensaio, níveis superiores de GSH (3x), GSSG (2x), tióis totais não-proteicos (2,5x), ROS (4x), MDA (4x) e da razão GSH/GSSG (1,5x) (Figura 3.36A-F), bem como das atividades enzimáticas GPx (4x) e CTT1(4x), (Figura 3.37B e E), aos do controlo à chegada do Ensaio III. Por outro lado, as atividades enzimáticas GR e G6PD (Figura 3.37A e C), do controlo à chegada, dos efetivos analisados neste ensaio correspondiam a metade e à décima parte dos valores determinados nos grupos congéneres do Ensaio III.

De novo, este conjunto de resultados sugerem que a pressão ambiental exercida pelas condições do habitat natural nos animais capturados no final de 2012, e utilizados neste ensaio era muito diferente daquela a que estiveram sujeitos os juvenis capturados para o ensaio III no final de 2011.

Mitocôndrio

A Figura 3.38 A-D revela que o cativo em gradiente de salinidade 35 provocou um aumento significativo do conteúdo em GSH e tióis totais não proteicos do mitocôndrio de brânquias de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, mas não afetou o conteúdo em GSSG, nem a razão GSH/GSSG ($p < 0,05$). A referida figura revela também que a exposição à atrazina (50 µg/L) provocou um aumento significativo do conteúdo em GSH, GSSG e tióis totais não proteicos de mitocôndrios branquiais de *transformers* do Lima, mas não afetou a razão GSH/GSSG. Contudo o cativo em gradiente de salinidade 35 e a exposição à atrazina (50 µg/L) provocaram um aumento significativo dos níveis de ROS de mitocôndrios branquiais de *transformers* do Lima (Figura 3.38E) ($p < 0,05$).

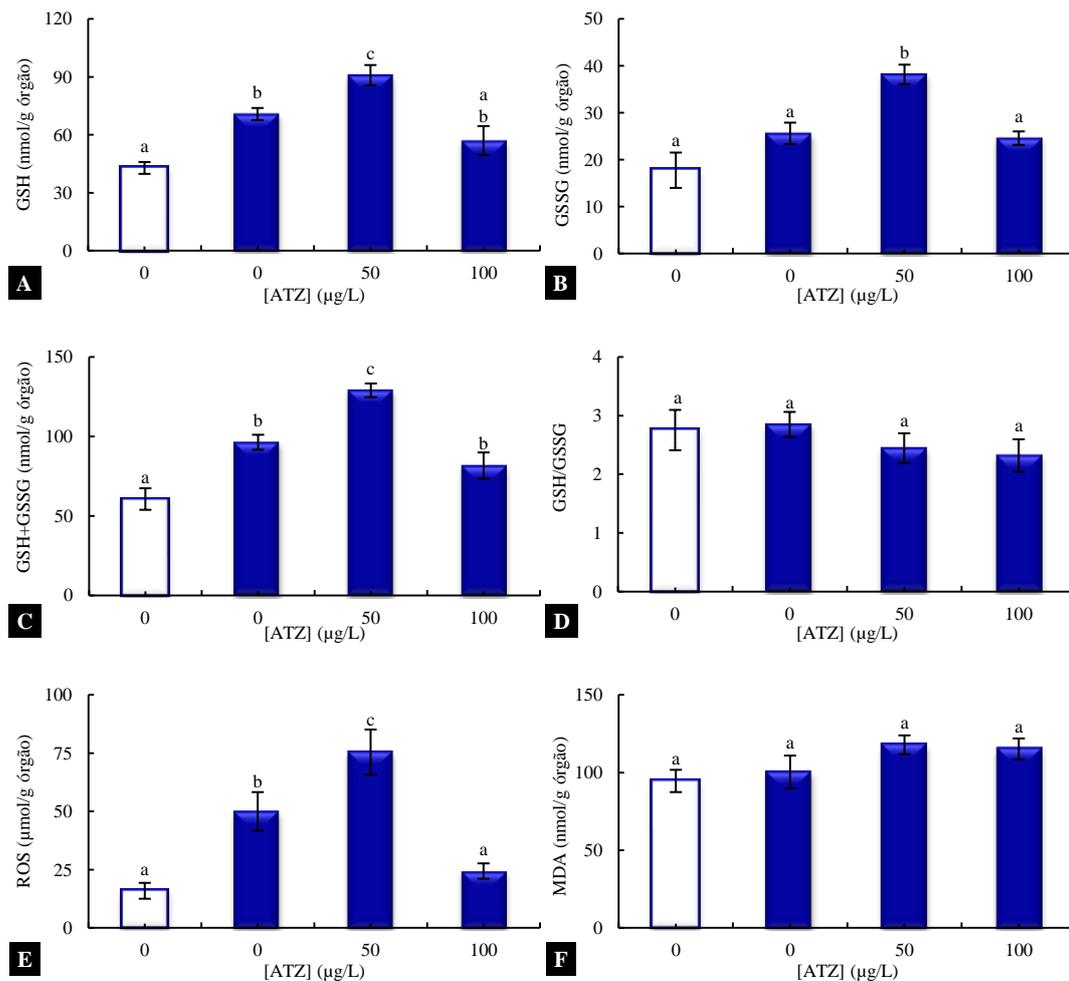


Figura 3.38 - Conteúdos em GSH (A), GSSG (B), tióis totais não-proteicos (C), razão GSH/GSSG (D), ROS (E) e MDA (F) do mitocôndrio branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do Lima do Ensaio IV no grupo controle à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

O nível de MDA mitocondrial das brânquias de *transformers* da bacia do Lima (Figura 3.38F) não foi afetado quer pelo cativo em gradiente de salinidade 35, quer pela exposição ao produto fitofarmacêutico.

Relativamente à atividade enzimática GPx da fração mitocondrial das brânquias de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima (Figura 3.39A), apenas os animais que contactaram com atrazina (100 µg/L) exibiram um aumento significativo desse parâmetro, resposta que poderá ter sido responsável pelo decréscimo dos níveis de ROS (Figura 3.38E) dos mitocôndrios branquiais nesse grupo de animais, bem como pela prevenção da ocorrência de danos oxidativos ($p < 0,05$). A Figura 3.39B revela que o cativo em gradiente de salinidade 35 despoletou um aumento significativo da atividade SOD2, mas não foi perturbado pelo contacto com a atrazina ($p < 0,05$).

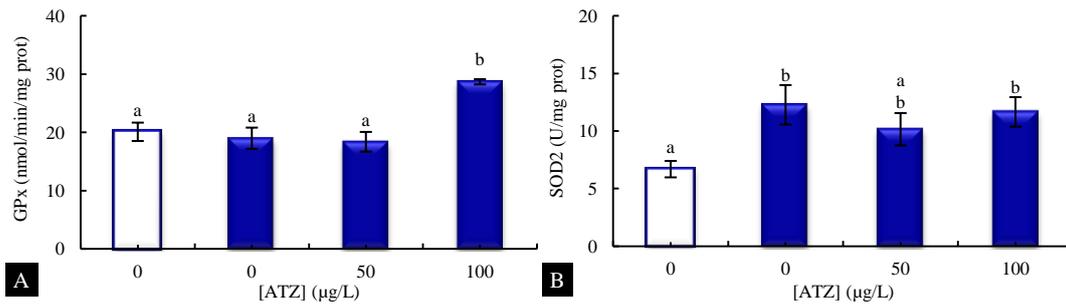


Figura 3.39 - Atividades enzimáticas GPx (A) e SOD2 (B) do mitocôndrio branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do Lima do Ensaio IV no grupo controlo à chegada (barra vazia) e submetidos a atrazina (50 e 100 µg/L) em meio aquático com 35 de salinidade ao longo de 28 dias (barras preenchidas). Os resultados representam a média de 5 *pools* de 3# animais ± erro padrão da média. Para cada parâmetro barras assinaladas com letras diferentes (a-b) são significativamente diferentes, teste de Duncan ($p < 0,05$).

Apesar de a Figura 3.36E revelar que o conteúdo em ROS citoplasmático de brânquias de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima era superior (~33x) ao detetado nos mitocôndrios dos referidos animais (Figura 3.38E), não se observaram indicadores de danos celulares compatíveis com a referida diferença. Tal facto dever-se-á à estabilização do ambiente redutor celular mediada pelo conteúdo em tióis totais não-proteicos (Figura 3.38C), superior ao do citoplasma (19x), bem como à elevada atividade GPx (Figura 3.37B) que na fração citoplasmática era superior (~24x) à do mitocôndrio (Figuras 3.39A).

Capítulo 4

Conclusões

A caracterização biométrica de juvenis de lampreia-marinha das quatro bacias analisadas neste ensaio mostrou que os juvenis capturados na bacia do Minho, apresentavam maior peso do fígado e de brânquias, índices hepato e branquio-somáticos e fator de condição de Fulton, sugerindo que se encontravam em melhores condições de crescimento e nutricionais. Contudo foram os animais do Lima aqueles que possuíam menor comprimento, peso do corpo, peso do fígado e brânquias, e índices hepato e branquio-somáticos, apontando para um início mais precoce da fase de migração trófica, eventualmente despoletado por condições pluviométricas da bacia do Lima. No entanto, foi nos efetivos da bacia do Vouga que se detetou o fator de condição de Fulton mais baixo, facto que aponta para um pior estado nutricional de *P. marinus* da referida bacia.

O fator de condição de Fulton calculado para os juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima, Vouga e Mondego assumiu valores idênticos aos de indivíduos em fase final de metamorfose, usualmente designados pela bibliografia consultada por *transformers* ou macroftalmias.

Os juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e do Vouga destacam-se entre os indivíduos das quatro bacias, por serem aqueles onde ocorreram maior número de alterações contrastantes dos parâmetros biométricos analisados, uma vez que observou-se nos efetivos do Vouga um decréscimo do peso do fígado e das brânquias, do índice hepato e branquio-somático e do fator K, com a aclimação a salinidade 35, resposta contrária à detetada nos animais do Lima, uma indicação de mobilização de reservas energéticas superior nos animais do Vouga durante a adaptação ao referido gradiente de salinidade. A maior debilidade do crescimento branquial nos efetivos da bacia do Vouga, comum à dos indivíduos da bacia do Minho poderá comprometer o sucesso da sua migração trófica. Por outro lado, o melhor estado nutricional dos animais da bacia hidrográfica do Lima, determinado a salinidade 35, permite indiciar para esses animais maior sucesso na migração trófica.

A caracterização dos sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* hepáticos e branquiais dos juvenis de lampreia-marinha das bacias analisadas neste ensaio, mostrou que os *transformers* capturados na bacia do Vouga possuíam ou encontravam-se nos grupos de animais com menor conteúdo em hemo e UDPGT hepáticos e cGST branquiais, GSH, GSSG, reservas de enxofre não proteico, razão GSH/GSSG hepáticos, bem como atividades G6PD e CTT1 hepáticas e branquiais. Além disso situavam-se também entre os que possuíam maior conteúdo em MDA branquial. Estes resultados destacam os indivíduos da bacia do Vouga como aqueles que exibiam maior número de indicadores de *stress* oxidativo, eventualmente

despoletados pelo maior contacto com xenobióticos do seu habitat, assim como pela incapacidade dos seus sistemas de biotransformação para a sua desintoxicação.

Por outro lado, os juvenis de *P. marinus* capturados na bacia do Lima agrupam-se entre os efetivos que exibiam menores condições de *stress* oxidativo, devido eventualmente ao menor contacto com poluentes aquáticos na bacia de origem, mas também a maior expressão funcional do sistema citocromo P450 e de conjugação de xenobióticos com o glicuronato hepáticos, assim como de conjugação com o glutationo no citoplasma branquial.

A aclimação ao sal apenas afetou a resposta ao *stress* pelos juvenis da bacia do Minho que se refletiu em termos de aumento do conteúdo em GSH hepático, GSSG hepático e branquial e atividade GR hepática, acompanhado por um decréscimo da razão GSH/GSSG hepática, atividade G6PD hepática e branquial e do conteúdo em ROS branquial. Deste modo, o contacto com o sal parece ter despoletado *stress* oxidativo no fígado de *transformers* do Minho, devido a uma atenuação do ciclo do glutationo, por indisponibilidade de equivalentes redutores sob a forma de NADPH.

No que diz respeito aos efetivos da bacia do Mondego, a resposta ao *stress* oxidativo também foi perturbada, com aumento do conteúdo em GSSG hepático e das atividades enzimáticas GR e CTT1 branquiais, acompanhada por um decréscimo da razão GSH/GSSG e do conteúdo em MDA hepáticos. No entanto, também se observaram alterações na resposta por sistemas de biotransformação, com decréscimo das atividades ECOD e mGST hepáticas e UDPGT branquiais. Assim, o contacto com o sal parece ter despoletado *stress* oxidativo hepático, sem contudo ocorrer aumento dos danos oxidativos, provavelmente devido aos sistemas de reposta antioxidantes ainda conseguirem responder adequadamente ao aumento do conteúdo em GSSG e à atenuação de atividades enzimáticas de biotransformação.

A aclimação ao sal nas bacias do Lima e do Vouga, não afetou os sistemas de resposta ao *stress* hepáticos, mas despoletou um aumento da capacidade branquial dos efetivos do Vouga para consumir peróxido de hidrogénio via CTT1, uma marca de morte celular por apoptose, alteração que não foi detetada nas brânquias dos animais da bacia do Lima, onde ocorreu uma atenuação de diversos marcadores de *stress* oxidativo como o conteúdo em GSH e ROS ou as atividades enzimáticas G6PD e GPx.

Alem disso, alterações de marcadores de biotransformação hepáticos como as atividades cGST e ECOD também foram detetados nas duas bacias. Embora o decréscimo da atividade cGST hepática seja comum aos efetivos de ambas as bacias, a atividade ECOD hepática aumentou nos juvenis do Vouga, mas diminuiu nos animais do Lima, alteração que surge combinada com um decréscimo dos níveis de danos oxidativos nesse tecido. O facto de

também se terem observado perturbações nos parâmetros de biotransformação UDPGT e cGST branquiais, apenas nos juvenis de lampreia-marinha, capturados na bacia do Lima, constitui um fator adicional de discriminação destas duas bacias.

As diferenças assinaladas nos parágrafos anteriores permitiram selecionar as bacias do Lima/Vouga como bacia pristina/com índice de exposição a poluentes mais elevado, para dar continuidade a este estudo no Ensaio II.

A análise dos parâmetros morfométricos determinados à chegada em juvenis de lampreia-marinha não permitiu distinguir, no Ensaio II os efetivos das bacias do Lima e do Vouga, com exceção do peso das brânquias e do índice branquio-somático que se revelaram mais elevados nos animais do Vouga.

A análise detalhada da exposição de juvenis de lampreia-marinha ao gradiente de salinidade 35, revelou que em geral, os parâmetros morfométricos comprimento, peso do corpo, fígado e brânquias, índices hepato e branquio-somáticos e o fator de condição de Fulton não foram perturbados pela exposição a salinidade 10, 25 e 35. Perturbações pontuais foram detetadas nos efetivos do Vouga expostos a salinidade 35, onde ocorreu um decréscimo do peso das brânquias e do índice branquio-somático, um sinal de toxicidade pelo sal. Além disso, detetou-se nos juvenis da bacia do Lima, expostos a salinidade 10, um decréscimo do índice hepato-somático e um aumento do peso das brânquias e do fator de condição de Fulton, alterações singulares ao contacto com o sal que se dissiparam ao longo do gradiente de salinidade 35.

Apesar da resposta ao gradiente de salinidade 35, em termos de parâmetros morfométricos, do Ensaio II, nem sempre se sobrepõe ao observado no Ensaio I, devido a condicionantes climáticos como a pluviosidade nos locais de captura, o decréscimo do peso das brânquias e do índice branquio-somático, detetados em juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga, em ambos os ensaios, poderá indiciar dificuldade persistente destes animais em concluir com sucesso a migração trófica, comparativamente com os efetivos da bacia do Lima, cujo perfil de parâmetros morfométricos durante a aclimação à salinidade 35, mostrou-se mais próximo do que se encontra descrito na bibliografia consultada.

A análise dos parâmetros de biotransformação e de resposta ao *stress* hepáticos e branquiais, permitiu observar que os juvenis da bacia do Vouga possuíam à chegada níveis mais baixos de hemo, CPR, GSH, GSSG, tióis totais não proteicos, GR, G6PD e CTT1 hepáticos, bem como de GSH, GSSG, tióis totais não proteicos, razão GSH/GSSG, G6PD e SOD1 branquiais, permanecendo a mesma relação ao longo de todo o ensaio nos níveis de GSH, GSSG e tióis totais não proteicos e CTT1 hepáticos, bem como os níveis de GSH e a

razão GSH/GSSG branquiais. Por outro lado, observou-se que os animais do Vouga possuíam à chegada níveis mais elevados de mGST, cGST e de ROS hepáticos e branquiais, permanecendo a mesma relação ao longo de todo o ensaio nos níveis de cGST do fígado e mGST das brânquias. Assim, à chegada, os juvenis de *P. marinus* da bacia do Vouga apresentavam menor capacidade de metabolização de xenobióticos pelo sistema citocromo P450, traduzido pelo menor conteúdo de hemo microsomal e de atividade CPR hepáticos. Além disso, também se encontrava diminuída a capacidade de resposta antioxidante hepática e branquial mediada pelo glutatono, traduzida pelo menor conteúdo em GSH e GSSG, reservas de enxofre não proteico do fígado e brânquias, bem como menor razão GSH/GSSG no tecido branquial, menor nível de atividades catalíticas GR, GPx e CTT1 hepáticas, bem como G6PD e SOD1 branquial. Em simultâneo, os juvenis de lampreia-marinha da bacia do Vouga exibiam maior capacidade de conjugação de xenobióticos com o glutatono, traduzida por níveis de atividade mGST e cGST hepáticos e branquiais mais elevados, uma marca de contacto com xenobióticos usualmente referida na literatura para espécies aquáticas. Este facto parece ser ainda confirmado pelos níveis de ROS hepáticos e branquiais, mais elevados em juvenis da referida bacia.

Embora grande parte dos parâmetros morfométricos não tenham sido perturbados pelo gradiente de salinidade, tal com descrito pela literatura consultada quando compararam juvenis de lampreia-marinha expostos a salinidade 0 e 35, a resposta molecular ao aumento da salinidade por sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* oxidativo hepáticos e branquiais, nem sempre acompanhou o referido raciocínio, uma vez que foram detetadas diversas perturbações nos referidos sistemas ao nível de conteúdos e atividades enzimáticas. Assim, em *transformers* da bacia do Lima expostos a salinidade 10, detetou-se um decréscimo das atividades UDPGT hepática, GPx e SOD1 branquiais, enquanto nos efetivos do Vouga foi detetado uma diminuição do conteúdo em ROS hepático, bem como das atividades UDPGT hepática e cGST branquial. A maior parte destas alterações metabólicas parecem ter sido pontuais, uma vez que a salinidade 25, apenas as atividades enzimáticas UDPGT hepática e SOD1 branquial dos juvenis de *P. marinus* do Lima, assim como a atividade UDPGT branquial dos efetivos do Vouga conservaram o referido decréscimo. Os resultados obtidos com juvenis de lampreia-marinha sujeitos a salinidade 25 foram também acompanhados pelo decréscimo dos níveis de MDA hepático e das atividade G6PD hepática, ALP e UDPGT branquiais, dos efetivos do Lima, bem como das atividades ALP branquial e razão GSH/GSSG hepática de *transformers* da bacia do Vouga. Entre as alterações descritas para salinidade 25, apenas o decréscimo da razão GSH/GSSG hepática de juvenis da bacia do

Vouga continuou a ser observada nos efetivos da mesma bacia a salinidade 35, uma indicação de que a exposição de juvenis *P. marinus* da bacia do Vouga a salinidade superior a 25 induziu *stress* oxidativo no tecido hepático, resposta aparentemente comprometedora do sucesso da adaptação à fase trófica por estes animais.

Surpreendentemente, as atividades UDPGT hepática de juvenis da bacia do Lima, UDPGT e GPx branquiais da bacia do Vouga aumentaram com a exposição a salinidade 35. Embora o aumento da atividade GPx tivesse sido também detetado nas brânquias dos animais da bacia do Vouga, não foi confirmado a salinidade 25, onde apenas ocorreu um aumento da atividade G6PD. Contudo, em juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, expostos a salinidade 35 detetou-se um aumento do conteúdo em GSSG e tióis totais não proteicos e das atividades CPR e mGST hepáticos, bem como do conteúdo em GSH, GSSG, tióis totais não proteicos e MDA branquiais.

Assim, os resultados obtidos no Ensaio II confirmam uma resposta distinta ao gradiente de salinidade 35, pelos animais de cada bacia, uma vez que nos animais do Lima se observou atenuação de componentes do sistema P450 e indução da capacidade de conjugação de xenobióticos com o glicuronato, bem como um aumento das reservas de enxofre não proteico hepático e branquial. Por outro lado, na bacia do Vouga observou-se um aumento da capacidade de transferência de equivalentes redutores sob a forma de NADPH, para os citocromos P450, bem como da capacidade de conjugação de xenobióticos com o glutatióno hepáticos. Contudo, em juvenis de *P. marinus* da referida bacia ocorreu uma transição do saudável ambiente redutor dos hepatócitos para um ambiente mais oxidante, facto que constitui uma marca de *stress* oxidativo. Parece que o aumento da capacidade branquial dos juvenis da bacia do Vouga para aumentar as reservas de enxofre e de eliminação de ROS, pelo ciclo do glutatióno, em resposta ao *stress* salino, não ocorreu no tecido hepático, uma fragilidade que pode justificar, em parte, as condições de *stress* oxidativo descritas para este tecido.

A segregação de juvenis de *P. marinus* capturados nas bacias do Lima e do Vouga em dois grupos distintos, quer à chegada quer na resposta ao gradiente de salinidade 35, por alguns marcadores biométricos e maioritariamente por diversos marcadores moleculares de biotransformação e de resposta ao *stress*, sugere que fatores ambientais e de memória molecular dos juvenis de cada bacia terão contribuído, para o efeito observado. Assim torna-se plausível suspeitar que o contacto prévio ou não com xenobióticos de natureza química distinta poderá ter modulado mecanismos de expressão enzimática como os que envolvem recetores Ah, que urge esclarecer em estudos posteriores. Este conjunto de resultados

permitiram confirmar a escolha da bacia do Lima como a mais pristina das duas bacias analisadas neste ensaio, tal como aconteceu no Ensaio I. Deste modo foi selecionada para o prosseguimento deste estudo no Ensaio III, onde se caracterizou a resposta a diferentes concentrações do herbicida atrazina, em ambiente dulçaquícola.

O contacto de *transformers* da bacia do Lima com a atrazina (1, 10, 50 e 100 µg/L) em ambiente dulçaquícola controlado, não afetou o comprimento, o peso do corpo e do fígado, o índice hepato e branquio-somático, assim como o fator de condição de Fulton. Apenas os efetivos expostos a atrazina (100 µg/L), exibiam o peso do fígado e valores de HSI inferiores ao controlo de ensaio, diferença que pode indiciar efeitos hepatotóxicos provocados por este nível de exposição ao produto fitofarmacêutico, um potencial candidato a biomarcador de exposição.

A eficácia do sistema P450 hepático de *transformers* da bacia do Lima, em ambiente dulçaquícola, poderá ter sido afetada pela exposição à atrazina (10 e 100 µg/L), devido ao bloqueio do fluxo de eletrões do coenzima NADPH até aos citocromos P450, associado ao decréscimo da atividade CPR.

O aumento da atividade mGST hepática de *transformers* da bacia do Lima que contataram com a atrazina, em particular nos níveis de exposição 50 e 100 (µg/L), em ambiente dulçaquícola, poderá ter contribuído para uma melhor sobrevivência desses juvenis à triazina em água doce, potenciando a sua capacidade de desintoxicação hepática. Todavia, uma indução monofuncional desse enzima, envolvendo complexos recetores diferentes do complexo AhR, parece constituir um sinal de debilidade na resposta ao produto fitofarmacêutico, uma vez que não se detetou indução concertada com as atividades CPR e ECOD.

A resposta diferencial da atividade cGST hepática de *transformers* da bacia do Lima, à atrazina em ambiente dulçaquícola, traduzida num acréscimo, para os níveis de exposição 10 e 100 (µg/L) e num decréscimo para o nível de exposição 50 (µg/L), poderá ter resultado do modo como a triazina modulou a expressão génica das subunidades peptídicas dos heterodímeros que asseguram a atividade GST no citoplasma hepático. O efeito inibitório exercido pela exposição à atrazina (50 µg/L), poderá ter sido compensado pelo seu congénere microsomal. Assim, a atividade mGST do retículo endoplasmático hepático de juvenis de lampreia-marinha, destacou-se entre os parâmetros de biotransformação analisados no fígado, como aquele que respondeu de forma inequívoca à triazina, candidatando-se a constituir um bom biomarcador de contacto com a atrazina em ambiente dulçaquícola. Embora as atividades enzimáticas hepáticas cGST e UDPGT indiciem alguma sensibilidade dos juvenis de

lampreia-marinha ao referido produto fitofarmacêutico, a resposta não foi tão clara como a dos enzimas mGST. Por outro lado, a atividade UDPGT parece ter desempenhado um papel relevante na desintoxicação de triazinas no tecido branquial de *transformers* da bacia do Lima, uma vez que se mostrou três a cinco vezes superior à detetada no tecido hepático dos mesmos animais.

O decréscimo da atividade cGST branquial de *transformers* da bacia do Lima devido ao contacto com atrazina (10 µg/L) ou superior, expressa a elevada sensibilidade das brânquias, primeira linha de contacto com contaminantes ambientais em espécies piscícolas, ao referido produto fitofarmacêutico. A relevância deste sistema de biotransformação de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, para preservar a integridade dos tecidos hepático e branquial, eliminando xenobióticos, pode ainda ser inferida pelo facto de a atividade média cGST branquial ser idêntica à detetada no tecido hepático. Todavia, os efeitos observados, quer no tecido branquial, quer no tecido hepático podem comprometer seriamente a eficiência dessa resposta, caso os animais ainda em água doce sejam expostos acidental ou permanentemente a níveis de atrazina iguais ou superiores a 10 µg/L, pelo que pode-se ainda especular que a atividade enzimática cGST branquial constitui um bom biomarcador de exposição à atrazina em juvenis de lampreia-marinha que ainda não contactaram com o ambiente salino.

Embora a exposição, em ambiente dulçaquícola, ao nível mais baixo de atrazina (1 µg/L) pareça comprometer a disponibilidade hepática de GSH citoplasmático, a exposição à atrazina (100 µg/L) contribuiu para aumentar a disponibilidade em enxofre não proteico e GSH, para ser provavelmente utilizado como co-substrato dos enzimas GST.

À primeira vista, a exposição à atrazina (1-100 µg/L), em ambiente dulçaquícola, parece não ter despoletado *stress* oxidativo no citoplasma hepático, uma vez que o conteúdo em GSH e ROS, bem como a razão GSH/GSSG de juvenis de *P. marinus* não se alterou. Contudo, duplicou o conteúdo em MDA citoplasmático hepático. Este resultado surpreendente parece não ser compatível com os níveis de ROS estimados em termos de quantidade de peróxido de hidrogénio e do potencial redox estabilizado pelo GSH. Uma explicação para esta alteração remete-se para o papel da atrazina como princípio ativo de herbicidas em que se comporta como inibidor da cadeia de transporte de eletrões do cloroplasto. É possível que esse mecanismo possa igualmente atuar sobre outras cadeias de transporte de eletrões com localização membranar, muito provavelmente ao nível do retículo endoplasmático. Como referido no sub-capítulo 3.1 a atividade enzimática CPR do retículo endoplasmático hepático sofreu um decréscimo significativo nos animais que contactaram com

a atrazina (100 µg/L). O bloqueio da cadeia de transporte de elétrons localizada no retículo pode ter então contribuído para gerar espécies reativas de oxigénio que não o H₂O₂, como o radical hidroxilo, capaz de desencadear danos celulares. Além disso a atividade GPx do citoplasma hepático de *transformers*, da bacia do Lima, em água doce diminuiu com o contacto com atrazina (100 µg/L). O referido decréscimo poderá, também, justificar o aumento do conteúdo em MDA, devido à perda de capacidade do citoplasma hepático para eliminar lipoperóxidos. Por outro lado, a exposição de juvenis de lampreia-marinha à atrazina (1-100 µg/L), em ambiente dulçaquícola, provocou um decréscimo da atividade GR, afetando a regeneração hepática do GSH. Assim, parece plausível utilizar as atividade enzimáticas GPx e GR como marcadores de exposição à triazina, em ambiente dulçaquícola, no primeiro caso para exposição igual ou superior a 100 µg/L e, no segundo caso, para o intervalo entre 1 e 100 µg/L. Além disso, a exposição de *transformers* da bacia do Lima à atrazina (50 µg/L) provocou um aumento da atividade G6PD, uma eventual tentativa dos hepatócitos para gerarem equivalentes redutores que não parece dirigida ao ciclo do glutatono, o seu usual consumidor, uma vez que o fluxo de elétrons via GR parece encontrar-se parcialmente bloqueado. Provavelmente esse excesso estaria a ser mobilizado para biossíntese *de novo* de lípidos, um processo que assiste à proliferação celular.

Embora pareça que o cativo e o contacto com a atrazina, em ambiente dulçaquícola não tenha afetado o ambiente redutor mitocondrial, modulado pelo glutatono, a exposição à atrazina (1 e 50 µg/L) levou a um aumento dos níveis de ROS mitocondriais, contribuindo para aumento de danos oxidativos, estimados pelo conteúdo em MDA mitocondrial que aumentaram em *transformers* expostos à atrazina (50 µg/L). Assim, neste caso, a ocorrência de danos oxidativos mitocondriais poderá ser devido ao abrandamento do ciclo do glutatono que atenuou a sua ação preventiva. Por outro lado, a exposição à atrazina (1 µg/L) despoletou um aumento da atividade SOD2 de juvenis de *P. marinus*. O aumento observado para o referido nível de exposição poderá ter prevenido a ocorrência e a acumulação de danos oxidativos no mitocôndrio, apesar do conteúdo em ROS detetado no organelo ter aumentado.

O nível de MDA do citoplasma hepático de juvenis de lampreia-marinha mostrou-se muito inferior (~3%) ao do mitocôndrio. A disparidade de conteúdos registada, poderá ser devida à indução inicial do metabolismo respiratório e aos níveis baixos de atividade GPx mitocondrial. Assim, admite-se que a exposição à atrazina possa ter comprometido o metabolismo energético hepático de juvenis de lampreia-marinha, ao provocar danos oxidativos na membrana interna mitocondrial hepática.

O conteúdo em GSH, as reservas de enxofre não proteico e a capacidade para estabilizar o ambiente redutor citoplasmático branquial de juvenis de lampreia-marinha da bacia Lima, em água doce, aumentou com o cativeiro. No entanto, essa resposta foi contrariada pela exposição à atrazina (1- 50 µg/L).

Os níveis de ROS e de atividade CTT1 citoplasmáticos branquiais de *transformers* da bacia do Lima, aumentaram com exposição à atrazina (50 e 100 µg/L), em ambiente dulçaquícola, enquanto os níveis de MDA e as atividades GPx e G6PD diminuíram. Este perfil de resposta poderá ter atenuado a regeneração de equivalentes redutores sob a forma de NADPH que assistem ao funcionamento do ciclo do glutatono, minimizando a resposta antioxidante do tripéptido. Por outro lado, o aumento da atividade CTT1 evidencia resposta complementar à do enzima GPx contra a peroxidação lipídica branquial, comportando-se assim como via alternativa ao ciclo do glutatono, uma vez que os danos celulares diminuíram quando o conteúdo em ROS aumentou.

O conteúdo em ROS e MDA mitocondriais de *transformers* da bacia do Lima aumentou com a exposição a atrazina (10 e 100 µg/L) e atrazina (10 e 50 µg/L), respetivamente. Falhas no transporte do GSH citoplasmático para o mitocôndrio, bem como a ausência de resposta pelas atividades GPx e SOD2 dos mitocôndrios branquiais de *transformers* do Lima, após exposição à atrazina (1-100 µg/L), poderão estar na origem do aumento de danos oxidativos, provocados pelo aumento de ROS mitocondrial. Esse perfil de resposta indicia perda da funcionalidade mitocondrial que pode ter sido despoletada pelo bloqueio da cadeia respiratória, perturbação capaz de prejudicar o sucesso da migração trófica de juvenis de *P. marinus*.

A continuação deste estudo exigiu a seleção de dois níveis de exposição à atrazina que permitissem avaliar a influência do produto fitofarmacêutico sobre parâmetros biométricos, sistemas de biotransformação e de resposta ao *stress* do fígado e brânquias de juvenis de lampreia-marinha, expostos a gradiente de salinidade 35. Optou-se pela exposição à atrazina (50 e 100 µg/L), por serem os níveis de exposição em ambiente dulçaquícola que mais afetaram os parâmetros analisados em termos biométricos, sistemas de biotransformação, antioxidantes e sistemas de resposta ao *stress* oxidativo.

O comprimento, o peso do corpo e o fator de condição de Fulton de juvenis de lampreia-marinha não foram afetados pela exposição à atrazina (50 ou 100 µg/L), em gradiente de salinidade 35, perfil de resposta idêntico ao detetado em ambiente dulçaquícola analisado no Ensaio III.

O índice hepato-somático de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima diminuiu com a exposição à atrazina (50 ou 100 µg/L) em gradiente de salinidade 35, enquanto o peso das brânquias e o índice branquio-somático apenas diminuíram com a atrazina (50 µg/L). Um decréscimo no índice hepato-somático foi também observado em ambiente dulçaquícola nos efetivos expostos a atrazina (100 µg/L). Contudo, o decréscimo do índice branquio-somático não foi detetado nos efetivos tratados em água doce. Alterações no índice hepato e branquio-somático, provocadas pela exposição à atrazina (50 µg/L) ou superior, em gradiente de salinidade 35, indiciam a ocorrência de efeitos tóxicos nas brânquias e fígado de *transformers* da bacia do Lima que poderão comprometer o sucesso da migração trófica.

As alterações descritas das atividades enzimáticas CPR, mGST e cGST nos animais expostos à atrazina (50 ou 100 µg/L), em ambiente dulçaquícola, deixaram de se observar nos efetivos que estiveram sujeitos à triazina em gradiente de salinidade 35.

A duplicação da atividade UDPGT de juvenis de *P. marinus*, expostos a atrazina (50 µg/L), em gradiente de salinidade 35, comparativamente com o controlo de ensaio, sugere que a atrazina, neste nível de exposição, possa ter sido eliminada pelo tecido hepático, via conjugação com o glicuronato.

A exposição de juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima à atrazina (100 µg/L), em gradiente de salinidade 35, promoveu a disponibilização intracelular de grupos fosfato no tecido branquial, uma vez que provocou um aumento da atividade ALP.

O bloqueio de reações de conjugação com o glicuronato, evidenciado pelo decréscimo da atividade UDPGT, detetado em juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima, expostos à atrazina (50 e 100 µg/L) em gradiente de salinidade 35, poderá ter contribuído para a acumulação da triazina ou de algum dos seus derivados tóxicos no tecido branquial, facto que permite considerar a referida atividade enzimática como biomarcador de exposição branquial de juvenis de *P. marinus* à atrazina, em ambiente salino.

Os níveis de atividade mGST e cGST branquiais de juvenis de lampreia-marinha mostraram-se, neste ensaio, superiores aos detetados no Ensaio III. Como o perfil de resposta à triazina, em termos de atividade cGST foi distinto do detetado em ambiente dulçaquícola, onde diminuiu para os níveis de exposição 50 ou 100 µg/L, é razoável assumir que a proteção branquial contra a atrazina foi maior quando a exposição de *transformers* da bacia do Lima, ao produto fitofarmacêutico decorreu em gradiente de salinidade 35.

O ambiente redutor do citoplasma hepático, caracterizado pela razão GSH/GSSG e níveis de ROS, bem como os sistemas de resposta antioxidante hepáticos, estimados pelo

conteúdo em GSH, GSSG, tióis totais não proteicos e atividades enzimáticas GR, GPx, G6PD e SOD1, de macroftalmias da bacia do Lima, não foram afetados pelo cativo, nem pela exposição à atrazina (50 e 100 µg/L), em gradiente de salinidade 35, perfil de resposta que diverge daquele que foi observado em ambiente dulçaquícola nos animais expostos à atrazina (100 µg/L), em termos de conteúdo em GSH, tióis totais não-proteicos e atividades GR e GPx, bem como de atividade GR nos animais expostos a atrazina (50 µg/L). Como os níveis de MDA e de atividade CTT1 hepáticos diminuíram em *transformers* da bacia do Lima que contactaram com atrazina (50 µg/L) ou atrazina (50 ou 100 µg/L), respetivamente, resposta mais uma vez divergente da que foi observada em ambiente dulçaquícola, pode-se assumir que a salinidade conferiu maior proteção contra danos oxidativos despoletados pela atrazina no citoplasma hepático de juvenis de lampreia-marinha.

A divergência registada entre os resultados obtidos nos grupos controlo à chegada dos Ensaio III e IV, em termos de conteúdo em GSSG, atividades GR e G6PD que eram inferiores em ambiente salino e dos conteúdos em ROS e MDA superiores nos efetivos expostos ao sal, apontam para diferente pressão ambiental exercida pelo habitat em cada período que precedeu a captura.

O ambiente redutor mitocondrial hepático de macroftalmias da bacia do Lima, caracterizado pela razão GSH/GSSG e pelo conteúdo em GSH, tióis totais não proteicos e ROS, bem como pelas atividades antioxidantes GPx e SOD2 não foi aparentemente afetado pela exposição à atrazina (50 e 100 µg/L) em ambiente salino. Surpreendentemente, o conteúdo em GSSG e o nível de danos oxidativos mitocondriais, estimados pelo conteúdo em MDA, aumentaram em *transformers* da bacia do Lima expostos à atrazina (50 µg/L) e (50 ou 100 µg/L), respetivamente. Embora o conteúdo em ROS citoplasmático hepático fosse, à chegada, superior (15x) ao determinado nos mitocôndrios, a razão GSH/GSSG e os níveis de MDA citoplasmáticos diminuíram ou não se alteraram com a exposição de juvenis de *P. marinus* do Lima à triazina, enquanto o conteúdo em MDA mitocondrial aumentou. Este tipo de resposta dever-se-á, provavelmente, à capacidade tampão redox do glutatióno, uma vez que no citoplasma hepático ocorreram níveis mais elevados do conteúdo em tióis totais não-proteicos (6x) e de atividade GPx (5x). Falhas de funcionalidade mitocondrial hepática poderão perturbar o metabolismo energético e conseqüentemente comprometer o sucesso da migração trófica de juvenis de *P. marinus* do Lima, quando expostos a níveis de atrazina iguais ou superiores a 50 µg/L, em ambiente salino. O conteúdo em MDA mitocondrial hepático candidata-se deste modo, a marcador de exposição a agentes de *stress* como a

atrazina, reforçando o que já tinha sido observado em estudo preliminar realizado neste laboratório (157).

A exposição à atrazina (50, 100 µg/L), em gradiente de salinidade 35, não afetou o conteúdo citoplasmático branquial em GSH, tióis totais não-proteicos e razão GSH/GSSG, bem como as atividades GR, GPx e SOD1, resposta divergente da detetada no Ensaio III, onde macroftalmias expostas a atrazina (50 µg/L), exibiram uma quebra do conteúdo em GSH, tióis totais não-proteicos e da razão GSH/GSSG, bem como da atividade GPx extensível aos efetivos expostos a atrazina (100 µg/L) na referida fração celular.

O conteúdo em GSSG e ROS citoplasmático branquial de macroftalmias do Lima aumentou com a exposição à atrazina (50 µg/L), em gradiente de salinidade 35. Além disso, a atividade enzimática CTT1 também aumentou nas mesmas condições de ensaio, resposta que poderá ter contribuído para a desintoxicação do peróxido de hidrogénio, no tecido branquial, favorecendo o decréscimo dos níveis de MDA, observada nos efetivos expostos à atrazina (50 ou 100 µg/L), maioritariamente idêntica à detetada no Ensaio III, para os mesmos níveis de exposição ao referido produto fitofarmacêutico.

A exposição à atrazina (100 µg/L) causou um decréscimo da atividade enzimática G6PD de juvenis de lampreia-marinha, resposta idêntica à determinada, em ambiente dulçaquícola, para os dois níveis de exposição ao produto fitofarmacêutico que poderá ter provocado uma atenuação da resposta metabólica pelo ciclo do glutationo do citoplasma branquial, devido a geração limitante de equivalentes redutores, sob a forma de NADPH, pela via das pentoses fosfato.

Os juvenis de lampreia-marinha do Lima, analisados no Ensaio IV, possuíam à chegada níveis citoplasmáticos branquiais muito superiores de GSH, GSSG, tióis totais não-proteicos, ROS, MDA, da razão GSH/GSSG e de atividades enzimáticas GPx e CTT1, aos determinados no Ensaio III. Por outro lado, os referidos animais, exibiam à chegada níveis de atividade GR e G6PD citoplasmáticos muito inferiores aos detetados à chegada do Ensaio III. Estes resultados sugerem mais uma vez que a pressão ambiental exercida pelas condições do habitat dos animais capturados no final de 2012, e analisados neste ensaio era muito diferente daquela a que estiveram sujeitos os juvenis capturados para o Ensaio III no final de 2011.

A exposição à atrazina (50 µg/L) provocou um aumento do conteúdo em GSH, GSSG e tióis totais não proteicos e ROS de mitocôndrios branquiais de *transformers* do Lima, mas não afetou a razão GSH/GSSG.

O nível de MDA mitocondrial das brânquias de juvenis de *P. marinus* da bacia do Lima não foi afetado pela exposição ao produto fitofarmacêutico. Apenas os juvenis de *P. marinus* da bacia do Lima que contataram com atrazina (100 µg/L) exibiram um aumento da atividade GPx dos mitocôndrios das branquiais, resposta que poderá ter condicionado o decréscimo dos níveis de ROS nesse grupo de animais, bem como a prevenção da ocorrência de danos oxidativos.

Embora o ambiente mais redutor do mitocôndrio branquial, estimado pela razão GSH/GSSG, possa ser explicado pelo menor conteúdo em ROS presente no referido organelo, torna-se difícil encontrar uma explicação para o fato, uma vez que o conteúdo em tióis totais não-proteicos e a atividade GPx mitocondriais eram muito inferiores aos determinados no citoplasma de juvenis de *P. marinus* da bacia do Lima, pelo que este resultado merece ser melhor esclarecido em estudos posteriores.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

1. Janvier P. Living Primitive Fishes and Fishes From Deep Time. *Fish Physiol.* 2007;26(C):1–51.
2. Maitland PS, Morris KH, East K. The Ecology of Lampreys (Petromyzonidae) in the Loch-Lomond Area. *Hydrobiologia* [Internet]. 1994;290(1–3):105–20. Available from: isi:A1994PN96700015
3. Hardisty MW, Potter IC. The behaviour, ecology and growth of larval lampreys. In: Hardisty MW, Potter IC, editors. *The Biology of Lampreys*. Londres: Academic Press; 1971. p. 85–126.
4. Almeida PR, Quintella BR. Sea Lamprey Migration: A Millennial Journey. In: Ueda H, Tsukamoto K, editors. *Physiology and Ecology of Fish Migration*. GRG Press; 2013. p. 105–31.
5. Xu Y, Zhu S, Li Q. Lamprey : a model for vertebrate evolutionary research. *Zoological Research.* 2016;37(5):1–7.
6. Green SA, Bronner ME. The lamprey : A jawless vertebrate model system for examining origin of the neural crest and other vertebrate traits. *Differentiation* [Internet]. 2014;87(1–2):44–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2014.02.001>
7. Hardisty MW. *Petromyzon marinus* (Linnaeus 1758). In: Holcík J, editor. *The freshwater fishes of Europe* [Internet]. AULA-Verlag Wiesbaden; 1986. p. 94–116. Available from: <http://www.fishbase.org/references/FBRefSummary.php?ID=12324>
8. McKenzie DJ, Farrel AP, Brauner CJ. *Primitive fishes*. Academic Press. 1st ed. 2007. ISBN-13: 978-0123736710
9. Hubbs CL, Potter IC. Distribution, phylogeny and Taxonomy. In: Hardisty MW, Potter IC, editors. *The Biology of Lampreys*. New York: Academic Press; 1971. p. 1–65.
10. Potter IC. The Petromyzoniformes with Particular Reference to Paired Species. *Can J Fish Aquat Sci.* 1980;37:1595–615.
11. NCBI. *Petromyzon marinus*, Taxonomy [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=7757>
12. Doadrio I, Sostoa A de. *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. 2nd ed. Doadrio I, editor. Madrid; 2002.
13. Mateus C, Rodríguez-Muñoz R, Quintella B, Alves M, Almeida P. Lampreys of the Iberian Peninsula: distribution, population status and conservation. *Endanger Species Res* [Internet]. 2012;16(2):183–98. Available from: <http://www.rdp.uevora.pt/handle/10174/7286%5Cnhttp://www.int-res.com/abstracts/esr/v16/n2/p183-198/>
14. Lança MJ, Rosado C, Machado M, Ferreira R, Alves-Pereira I, Quintella BR, et al. Can muscle fatty acid signature be used to distinguish diets during the marine trophic phase of sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.)? *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* [Internet]. 2011;159(1):26–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.01.006>
15. Almeida PR, Tomaz G, Andrade NO, Quintella BR. Morphological analysis of geographic variation of sea lamprey ammocoetes in Portuguese river basins. *Hydrobiologia* [Internet]. 2008;602(1):47–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-008-9285-4>
16. Salaberria I, Hansen BH, Asensio V, Olsvik PA, Andersen RA, Jenssen BM. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2009;234(1):98–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.023>
17. Hansen MJ, Madenjian CP, Slade JW, Steeves TB, Almeida PR, Quintella BR. Population ecology of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) as an invasive species in the Laurentian Great Lakes and an imperiled species in Europe. *Rev Fish Biol Fish* [Internet]. 2016;26(3):509–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-016-9440-3>
18. Smith J, Kuraku S, Holt C, Tatjana S-S, Jiang N, Campbell M, et al. Supplement. Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nat Genet* [Internet]. 2013;45(4):415–21, 421e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2568>
19. Rogado L (Coord. . *Petromyzon marinus*. In: Cabral M, Almeida J, Almeida P, Delinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira M, et al., editors. *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal* [Internet]. Lisboa: Guide - Artes Gráficas, Lda; 2005. p. 65–6. Available from: <http://www.icnf.pt/portal/naturaclas/patrinatur/lvv/lista-peixes>

20. Vasconcelos RP, Reis-Santos P, Fonseca V, Maia A, Ruano M, França S, et al. Assessing anthropogenic pressures on estuarine fish nurseries along the Portuguese coast: A multi-metric index and conceptual approach. *Sci Total Environ*. 2007;374(2–3):199–215.
21. Applegate V c. Natural History of the Sea Lamprey, *Petromyzon marinus*, in Michigan. Canada; 1950.
22. Correia F, Fonseca C. Penacova, o Mondego e a Lampreia [Internet]. Penacova; 2010. 276 p. Available from: http://www.tetrapak.com/br/reciclagem/ciclo_de_vida_da_embalagem/pages/ciclo_da_embalagem.aspx
23. Beamish FWH. Osmoregulation in Juvenile and Adult Lampreys. *Can J Fish Aquat Sci*. 1980;37(11):1739–50.
24. Teorema P, Central L, Teorema P, Central L, Gosset WS, Adam RD, et al. Morphometric variation of the endangered Caspian lamprey, *Caspiomyzon wagneri* (Pisces: Petromyzontidae), from migrating stocks of two rivers along the southern Caspian Sea. *Gt Lakes Fish Comm Tech Rep* [Internet]. 2014;55(6):56. Available from: <http://www.zoologicalstudies.com/content/54/1/56>
25. Schulte PM. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J Exp Biol*. 2014;(217):23–34.
26. Cañedo-argüelles M, Sala M, Peixoto G, Prat N, Faria M, Soares AMVM, et al. Science of the Total Environment Can salinity trigger cascade effects on streams ? A mesocosm approach. *Sci Total Environ* [Internet]. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.039>
27. O'Boyle RN, Beamish FWH. Growth and intermediary metabolism of larval and metamorphosing stages of the landlocked sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Environ Biol Fishes*. 1977;2(2):103–20.
28. Hardisty MW. Physiological adaptations of the living agnathas. *Earth Environ Sci Trans R Soc Edinburgh*. 2011;80(3–4):241–54.
29. Beamish FWH, Potter IC, Thomas E. Proximate Composition of the Adult Anadromous Sea Lamprey, *Petromyzon marinus*, in Relation to Feeding, Migration and Reproduction. *J Anim Ecol*. 1979;48(1):1–19.
30. Perea S, Garzón P, González JL, Almada VC, Pereira A, Doadrio I. Nuevos datos de distribución de especies autóctonas de peces de agua dulce de España. *Graellsia*. 2011;67(1):91–102.
31. Reviewed distribution maps for *Petromyzon marinus* (sea lamprey) with modelled year 2010 native range map based on IPCC A" emissions scenario, version of August, 2013 [Internet]. 2016 [cited 2016 Jun 24]. Available from: www.fishbase.org
32. Andrade NO, Quintella BR, Ferreira J, Pinela S, Póvoa I, Pedro S, et al. Sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) spawning migration in the Vouga river basin (Portugal): Poaching impact, preferential resting sites and spawning grounds. *Hydrobiologia*. 2007;582(1):121–32.
33. Freyhof J, Brooks E. European Red List of Freshwater Fishes [Internet]. Cabral M, Almeida J, Almeida P, Delinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira M, et al., editors. *Fish Physiology*. Lisboa: Publications Office of the European Union; 2011. Available from: <http://europa.eu>
34. Dong S, Kang M, Wu X, Ye T. Development of a promising fish model (*Oryzias melastigma*) for assessing multiple responses to stresses in the marine environment. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-17.
35. Chen X, Li L, Wong CKC, Cheng SH. Rapid adaptation of molecular resources from zebrafish and medaka to develop an estuarine/marine model. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2009;149(4):647–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.01.009>
36. Assis CA. 1990, Assis, Threats to the survival lampreys. *J Fish Biol*. 1990;(37):225–6.
37. ICNB. *Petromyzon marinus*. Plano Sectorial da Rede Natura 2000; 2005 p. 1–7.
38. Schlenk D, Lavado R. Impacts of climate change on hypersaline conditions of estuaries and xenobiotic toxicity. *Aquat Toxicol* [Internet]. 2011;105(3–4 SUPPL.):78–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.023>
39. Tuan T, Kaminishi Y, Funahashi A, Hassanin AAI, Itakura T. Cloning and tissue expression of cytochrome P450 1B1 and 1C1 genes from Javanese Medaka, *Oryzias Javanicus*, under environmental stress conditions. 2014;13(20):2028–40.
40. Bezirci G, Akkas SB, Rinke K. Impacts of salinity and fish-exuded kairomone on the survival and macromolecular profile of *Daphnia pulex*. *Ecotoxicology*. 2012;601–14. DOI 10.1007/s10646-011-0820-0

41. Gonzalez RJ. The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish : a review. *J Comp Physiol B*. 2012;321–9. DOI 10.1007/s00360-011-0624-9
42. Isabel M, Oliveira F De, Lamy E, Bugalho MN, Vaz M. Avaliação de Estratégias de Ingestão de Herbívoros em Ecossistemas Mediterrânicos : Uma Revisão das Principais Questões e Metodologias [14 pt] Assessing Foraging Strategies of Herbivores in Mediterranean Oak Woodlands : 2015;2015.
43. Ameer W Ben, Lapuente J De, El Y, Barhoumi B, Trabelsi S, Camps L, et al. Oxidative stress , genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2012;64(2):241–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.11.026>
44. Reis-Santos P, McCormick SD, Wilson JM. Ionoregulatory changes during metamorphosis and salinity exposure of juvenile sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.). *J Exp Biol*. 2008;211:978–88.
45. Lavado R, Shi D, Schlenk D. Effects of salinity on the toxicity and biotransformation of l - selenomethionine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos : Mechanisms of oxidative stress. *Aquat Toxicol* [Internet]. 2012;108:18–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.001>
46. Lavado R, Fabre RA, Schlenk D. Effects of salinity acclimation on the expression and activity of Phase I enzymes (CYP450 and FMOs) in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol Biochem*. 2015; 40(1): 267–278. DOI:10.1007/s10695-013-9842-2.
47. Docker MF. Lampreys: Biology, Conservation and Control. Noakes DLG, editor. Vol. 1. Msnitoba: Springer International Publishing; 2015.
48. Bartels H, Docker MF, Fazekas U, Potter IC. Functional and evolutionary implications of the cellular composition of the gill epithelium of feeding adults of a freshwater parasitic species of lamprey, *Ichthyomyzon unicuspis*. *Can J Zool*. 2012;1283:1278–83.
49. Moser ML, Jackson AD, Lucas MC, Mueller RP. Behavior and potential threats to survival of migrating lamprey ammocoetes and macrophthalmia. *Rev Fish Biol Fish*. 2015;25(1):103–16.
50. Hume J. The Evolutionary Ecology of Lampreys (*Petromyzontiformes*) John B . Hume. 2013;252.
51. Hahn ME, Woodin BR, Stegeman JJ, Tillitt DE. Aryl hydrocarbon receptor function in early vertebrates: inducibility of cytochrome P450 1A in agnathan and elasmobranch fish. *Comp Biochem Physiol - Part C Toxicol Pharmacol*. 1998;120(1):67–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9827018>
52. Rotchell JM, Steventon GB, Bird DJ. Catalytic properties of CYP1A isoforms in the liver of an agnathan (*Lampetra fluviatilis*) and two species of teleost (*Pleuronectes flesus*, *Anguilla anguilla*). *Comp Biochem Physiol - Part C Toxicol Pharmacol*. 2000;125(2):203–14.
53. Parente TEM, Beghini DG, Chapeaurouge DA, Perales J. Lack of constitutive and inducible ethoxyresorufin-O-deethylase activity in the liver of suckermouth armored catfish (*Hypostomus affinis* and *Hypostomus auroguttatus*, Loricoriidae). *Comp Biochem Physiol - Part C Toxicol Pharmacol*. [Internet] 20.09;150(2):252–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.006>
54. Ribalta C, Solé M. In vitro interaction of emerging contaminants with the cytochrome P450 system of mediterranean deep-sea fish. *Environ Sci Technol*. 2014;48(20):12327–35.
55. Bohne VJ, Hamre K, Arukwe A. Hepatic metabolism , phase I and II biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo Salar*, L) during a 12 week feeding period with graded levels of the synthetic antioxidant, ethoxyquin. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:733–46.
56. Berntssen MHG, Tollefsen K, Handy RD, Julshamn K, Aasen K, Helland E, et al. Assessing sensitivity of Atlantic salmon post-smolt to dietary endosulfan using histology and markers of endocrine disruption , oxidative stress , and biotransformation. *Aquaculture* [Internet]. 2010;303(1–4):86–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.002>
57. Carson R. Silent spring. Vol. 36, Forestry. 1962. 195-198 p.
58. Anderson G, Beischlag T V, Vinciguerra M, Mazzocchi G. The circadian clock circuitry and the AHR signaling pathway in physiology and pathology. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2013;85(10):1405–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.022>
59. Shimba S, Watabe Y. Crosstalk between the AHR signaling pathway and circadian rhythm. 2009;77:560–5.

60. Leaver MJ, Wright J, Hodgson P, Boukouvala E, George SG. Piscine UDP-glucuronosyltransferase 1B. *Aquat Toxicol.* 2007;84(3):356–65.
61. Guyot E, Chevallier A, Barouki R, Coumoul X. The AhR twist: Ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov Today [Internet].* 2013;18(9–10):479–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.11.014>
62. Gu Y, Hogenesch JB, Bradfield CA. THE PAS SUPERFAMILY : Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000;40:519–61.
63. Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3608–15.
64. Chang Z, Lu M, Kim S, Park J. Potential role of HSP90 in mediating the interactions between estrogen receptor (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Toxicol Lett [Internet].* 2014;226(1):6–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.032>
65. B ARFORNF-, Vogel CFA, Khan EM, Leung PSC, Gershwin ME, Chang WLW, et al. Cross-talk between Aryl Hydrocarbon Receptor and the Inflammatory Response. 2014;289(3):1866–75.
66. Monostory K, Pascucci J-M, Kóbori L, Dvorak Z. Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metab Rev.* 2009;41(4):547–72.
67. Guengerich FP. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Perspective.* 2008;21(December 2007):70–83.
68. Kim D, Cha GS, Nagy LD, Yun CH, Guengerich FP. Kinetic analysis of lauric acid hydroxylation by human cytochrome P450 4A11. *Biochemistry.* 2014;53(39):6161–72.
69. Shimada T, Murayama N, Okada K, Funae Y, Yamazaki H, Guengerich FP. Different mechanisms for inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic inhibitors. *Chem Res Toxicol [Internet].* 2007;20(3):489–96. Available from: pm:17291012
70. Zmrzljak UP, Rozman D. Circadian Regulation of the Hepatic Endobiotic and Xenobiotic Detoxification Pathways: The Time Matters. 2012;
71. Tanimura N, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Aryl hydrocarbon receptor-mediated Cyp1a1 expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner. *Toxicology [Internet].* 2011;290(2–3):204–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.09.007>
72. Claudel T, Cretenet G, Saumet A, Gachon F. Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3626–33.
73. Oesch-Bartlomowicz B, Oesch F. Role of cAMP in mediating AHR signaling. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(4):627–41.
74. Beaulé C, Swanstrom A, Leone MJ, Herzog ED. Circadian modulation of gene expression, but not glutamate uptake, in mouse and rat cortical astrocytes. *PLoS One.* 2009;4(10).
75. Bartels H, Potter IC. Cellular composition and ultrastructure of the gill epithelium of larval and adult lampreys: implications for osmoregulation in fresh and seawater. *J Exp Biol [Internet].* 2004;207(Pt 20):3447–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339941>
76. Sayeed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2003;56(2):295–301.
77. Morris R. The biology of lampreys. Osmoregulation. 1972. 193-239 p.
78. Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Rainbow PS. Ecological Biomarkers, Indicators of Ecotoxicological Effects. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2013.
79. Klaassen CD, Watkins JB. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange) [Internet]. 2012. 7 p. Available from: <http://books.google.com/books?id=7QITe0DcPKsC&pgis=1>
80. Ortiz de Montellano PR. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. 3rd ed. Ortiz de Montellano PR, editor. New York; 2004 p.
81. Donohue MJ. The Detoxification System Part II : Hepatic Biotransformation. 2002;
82. Fernandes J, Amorim R, Azevedo I, Martins MJ. In vitro modulation of alkaline phosphatase activity of

- Saccharomyces cerevisiae grown in low or high phosphate medium. Braz J Med Biol Res. 2008;41(1):41–6.
83. Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and Clinical Significance of Alkaline Phosphatase Isoenzyme Patterns. Crit Rev Clin Lab Sci [Internet]. 1994;31(3):197–293. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/10408369409084677>
 84. Millán JL, Fishman WH, Stinson R. Biology of Human Alkaline Phosphatases with Special Reference to Cancer. Crit Rev Clin Lab Sci [Internet]. 1995;32(1):1–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/10408369509084680>
 85. Chen HT, Xie LP, Yu ZY, Xu GR, Zhang RQ. Chemical modification studies on alkaline phosphatase from pearl oyster (*Pinctada fucata*): A substrate reaction course analysis and involvement of essential arginine and lysine residues at the active site. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(7):1446–57.
 86. Coleman JE. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1992;21:441–83.
 87. Thulasi K V., Asifa KP, Chitra KC. Acute exposure to bisphenol-A altered muscular antioxidant system in cichlid fish, *Etilopplus maculatus* (Bloch, 1795). Gobal J Res Anal. 2015;4(8):2277–8160.
 88. Abdelkhalek NKM, Ghazy EW, Abdel-Daim MM. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. Environ Sci Pollut Res. 2015;22(4):3023–31.
 89. Molina R, Moreno I, Pichardo S, Jos A, Moyano R, Monterde JG, et al. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in *Tilapia* fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. Toxicol. 2005;46(7):725–35.
 90. Pezzementi L, Chatonnet A. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. Chem Biol Interact. 2010;187(1–3):27–33.
 91. Guengerich FP. Reactions and Significance of Cytochrome P-450 Enzymes. J Biol Chem. 1991;266(16):10019–22.
 92. Guengerich FP. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. Chem Res Toxicol [Internet]. 2001;14(6):611–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/tx0002583>
 93. Burkhardt T, Letzel T, Drewes JE, Grassmann J. Comprehensive assessment of Cytochrome P450 reactions: A multiplex approach using real-time ESI-MS. Biochim Biophys Acta - Gen Subj [Internet]. 2015;1850(12):2573–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.016>
 94. Maroneze MM, Zepka LQ, Vieira JG, Queiroz MI, Jacob-Lopes E. A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. Rev Ambient e Agua. 2014;9(3):445–58.
 95. Akhtar T, Shafi N, Ali G. Length-weight relationship, condition factor and sex-ratio of snow trout (*Schizothorax plagiostomus*, Heckel, 1938) from Neelum and Jhelum rivers, Muzaffarabad, Azad Kashmir. Int J Fish Aquat Stud. 2016;4(3):513–7.
 96. Guengerich FP, Waterman MR, Egli M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 2016;37(8):625–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>
 97. Omura, Tsuneo; Sato R. The Carbon Monoxide-binding pigment of Liver Microsomes. J Biol Chem. 1964;239(7):2370–8.
 98. Nebert DW. The Ah Locus: Genetic Differences in Toxicity, Cancer, Mutation, and Birth Defects. Crit Rev Toxicol [Internet]. 1989;20(3):153–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/10408448909017908>
 99. Devlin TM. Biochemistry, Libro de texto con aplicaciones clínicas. 5th ed. Devlin TM, editor. New Jersey: Editorial Reverté, S. A.; 2006.
 100. Devlin TM. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. 6th ed. Hoboken, editor. Jonh Wiley & Sons; 2006. 1208 p.
 101. Coon MJ. Enzyme ingenuity in biological oxidations: A trail leading to cytochrome P450. J Biol Chem [Internet]. 2002;277(32):28351–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R200015200>
 102. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 6th ed. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company; 2012.

103. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Microbiologia de Brock. 10ed ed. 2004. 620 p.
104. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 4th ed. Jonh Wiley & Sons; 2011.
105. Apel K, Hirt H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annu Rev Plant Biol [Internet]. 2004;55(1):373–99. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
106. Uno T, Ishizuka M, Itakura T. Cytochrome P450 (CYP) in fish. Environ Toxicol Pharmacol [Internet]. 2012;34(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.02.004>
107. Yamazaki H, Johnson WW, Ueng Y, Shimada T, Guengerich FP. Lack of Electron Transfer from Cytochrome b 5 in Stimulation of Catalytic Activities of Cytochrome P450 3A4. The Journal of Biological Chemistry. 1996;271(44):27438–44.
108. Cravedi JP, Perdu-Durand E, Paris A. Cytochrome P450 dependent metabolic pathways and glucuronidation in trout liver slices. Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol [Internet]. 1998;121(1–3):267–75. Available from: [wos:000077344800023](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001071399800023)
109. Henczová M, Deér AK, Komlósi V, Mink J. Detection of toxic effects of Cd²⁺ on different fish species via liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectroscopy. Anal Bioanal Chem. 2006;385(3):652–9.
110. Elcombe CR, Franklin RB, Lech JJ. Induction o microsomal hemoproteins P450 in the rat and rainbow trout by polyhalogenated biphenyls. Ann N Y Acad Sci. 1979;320(1)193-203.
111. Haasch ML, Graf WK, Quardokus EM, Mayer RT, Lech JJ. Use of 7-alkoxyphenoxazones, 7-alkoxycoumarins and 7-alkoxyquinolines as fluorescent substrates for rainbow trout hepatic microsomes after treatment with various inducers. Biochem Pharmacol. 1994;47(5):893–903.
112. Ueng Y-F, Ueng T-H. Induction and Purification of Cytochrome P450 1A1 from 3-Methylcholanthrene-Treated Tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. Arch Biochem Biophys. 1995;322(2):347–56.
113. Oost D, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. Environmental Toxicol Pharmacol. 2003;13(2):57–149.
114. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36(2):189–204.
115. Miller HC, Mills GN, Bembo DG, MacDonald JA, Evans CW. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchii* as an indicator of environmental pollution in Antarctica: Assessment by quantitative RT-PCR. Aquat Toxicol. 1998;44(3):183–93.
116. Perkins EJ, El-Alfy A, Schlenk D. In vitro sulfoxidation of aldicarb by hepatic microsomes of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Toxicol Sci. 1999;48(1):67–73.
117. Quirós L, Jarque S, Lackner R, Fernández P, Grimalt JO, Piña B. Physiological response to persistent organic pollutants in fish from mountain lakes: Analysis of Cyp1A gene expression in natural populations of *Salmo trutta*. Environ Sci Technol. 2007;41(14):5154–60.
118. Schneider JC. Manual of fisheries survey methods II: with periodic updates. Michigan Department of Natural Resources. Fish Spec Rep. 2000;25.
119. González JF, Reimschuessel R, Shaikh B, Kane AS. Kinetics of hepatic phase I and II biotransformation reactions in eight finfish species. Mar Environ Res. 2009;67(4–5):183–8.
120. Whyte JJ, Jung RE, Tillitt DE. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. Crit Rev Toxicol [Internet]. 2008;30(4):347–570. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10408770091159239>
121. Gupta AK, Ahmad M. Cytochrome P450 System as a Toxicity Biomarker. Imperial Journal of Interdisciplinary Research. 2016;(9):1151–9.
122. Burgeot T, Bocquéné G, Porte C, Dimeet J, Santella RM, Garcia De La Parra LM, et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. Mar Ecol Prog Ser. 1996;131(1–3):125–41.
123. Guimarães L, Gravato C, Santos J, Monteiro LS, Guilhermino L. Yellow eel (*Anguilla anguilla*) development in NW portuguese estuaries with different contamination levels. Ecotoxicology. 2009;18(4):385–402.

124. Wang X, Li J, Xing H, Xu S. Review of Toxicology of Atrazine and Chlorpyrifos on Fish. *J Northeast Agric Univ (English Ed [Internet])*. 2011;18(4):88–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1006-8104\(12\)60031-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1006-8104(12)60031-2)
125. Quintas A, Freire AP, Halpern MJ. *Bioquímica, Organização Molecular da Vida*. Lidel - Edições Técnicas, Lda; 2008.
126. Yang S, Xu F, Zheng B, Wu F, Wang S. Multibiomarker responses upon exposure to tetrabromobisphenol A in the freshwater fish *Carassius auratus*. *Aquat Toxicol [Internet]*. 2013;142–143:248–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.013>
127. Clarke DJ, Georget SG, Burchell B. Multiplicity of UDP-glucuronosyltransferases in fish. *Biochem J*. 1992;284:417–23.
128. Nóvoa-Valiñas MC, Pérez-López M, Melgar-Riol MJ. Hepatic glutathione S-transferases from lamprey (*Petromyzon marinus*): Purification and characterization. *Biochem Syst Ecol*. 2004;32(2):169–78.
129. Rouimi P, Anglade P, Debrauwer L, Tulliez J. Characterization of pig liver glutathione S-transferases using HPLC-electrospray-ionization mass spectrometry. *Biochem J [Internet]*. 1996;317 (Pt 3:879–84. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1217567&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
130. Mantilla J. *Hepatic Phase I and II Biotransformation Kinetics in Fishes: A Comparative Study*. 2006.
131. Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J*. 1991;274:409–14.
132. Guengerich FP. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007;21(4):163–8.
133. Dafré A, Sies H, Akerboom T. Protein S-thiolation and regulation of microsomal glutathione transferase activity by glutathione redox couple. *Arch Biochem Biophys [Internet]*. 1996;2(332):288–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1996.0344>
134. Habig WH, Pabst MJ, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias IM, Jakoby WB. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 1974;71(10):3879–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.71.10.3879>
135. George SG, Taylor B. Molecular evidence for multiple UDP-glucuronosyltransferase gene families in fish. *Mar Environ Res*. 2002;54(3–5):253–7.
136. Sherratt PJ, Hayes JD. Glutathione S-transferases. In: Ioannides C, editor. *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley & Sons Ltd; 2002. p. 319–52.
137. Dejong J, Morgenstern R, Jorvall H, Depierre J, Tu CD. Gene Expression of Rat and Human Microsomal Glutathione S-Transferases. 1988;8430–6. Available from: <http://www.jbc.org/content/263/17/8430.full.pdf>
138. Contreras-Vergara CA, Valenzuela-Soto E, García-Orozco KD, Sotelo-Mundo RR, Yepiz-Plascencia G. A mu-class glutathione S-transferase from gills of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: Purification and characterization. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007;21(2):62–7.
139. Pereira S, Pinto AL, Cortes R, Fontainhas-Fernandes A, Coimbra AM, Monteiro SM. Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013;90:157–66.
140. Van Der Oost R, Goksøyr A, Celandier M, Heida H, Vermeulen NPE. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: Pollution-induced responses. *Aquat Toxicol*. 1996;36(3–4):189–222.
141. Egaas E, Skaare J, Svendsen N, Sandvik M, Falls J, Dauterman W, et al. A comparative study of effects of atrazine on xenobiotic metabolizing enzymes in fish and insect, and of metabolizing enzymes in fish and insect, the in vitro phase II atrazine metabolism in some fish, insects, mammals and one plant species. *Comp Biochem Physiol C*. 1993;106(1):141–9.
142. Choi CY, An KW, An MI. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008;149(3):330–7.

143. Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(11):2685–700.
144. Lushchak O V., Kubrak OI, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* [Internet]. 2009;76(7):932–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>
145. Van Der Oost R, Vindimian E, Van Den Brink PJ, Satumalay K, Heida H, Vermeulen NPE. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquat Toxicol*. 1997;39(1):45–75.
146. Bebianno MJ, Lopes B, Guerra L, Hoarau P, Ferreira AM. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. *Environ Int*. 2007;33(4):550–8.
147. Lushchak VI. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C Adaptive response to oxidative stress : Bacteria , fungi , plants and animals. 2011;153:175–90.
148. Damiens G, Minier C. The Multixenobiotic Transport System, System Governing Intracellular Contaminant Bioavailability. In: Amiard-Triquet, Rainbow PS, Roméo M, editors. *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC; 2011.
149. Kurelec B. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol*. 1992;22(1):23–43.
150. Otto DME, Moon TW. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1996;31(1):141–7.
151. Maitland PS. *Ecology of the River, Brook and Sea Lamprey*. *Conserving Natura 2000 Rivers*, Ecology Series No.5. 2000;(5):54. ISBN 1 85716 706 6.
152. Solé M, Antó M, Baena M, Carrasson M, Cartes JE, Maynou F. Hepatic biomarkers of xenobiotic metabolism in eighteen marine fish from NW Mediterranean shelf and slope waters in relation to some of their biological and ecological variables. *Mar Environ Res* [Internet]. 2010;70(2):181–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.04.008>
153. Papakostas S, Vasema A. A proteomics approach reveals divergent molecular responses to salinity in populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Molecular Ecology*. 2012;3516–30.
154. Lavado R, Aparicio-Fabre R, Schlenk D. Effects of salinity acclimation on the expression and activity of Phase I enzymes (CYP450 and FMOs) in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Computer (Long Beach Calif)*. 2014;40(1):267–78.
155. Larsen PF, Nielsen EE, Meier K, Olsvik PA, Hansen MM, Loeschcke V. Differences in Salinity Tolerance and Gene Expression Between Two Populations of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in Response to Salinity Stress. *Biochem Genet*. 2012;454–66.
156. Nero V, Farwell A, Lee LEJ, Meer T Van, Mackinnon MD, Dixon DG. The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch : Gill and liver histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006;65:252–64.
157. Candeias M, Alves-Pereira I, João Lança M, Ferreira AF, Quintella BR, Almeida PR, et al. Can mitochondrial malondialdehyde content be a useful tool to evaluate sea lamprey juveniles' capacity to seawater acclimatization? *Green Process Synth*. 2015;4(2):133–9.
158. Radjendirane V, Jaiswal AK. Antioxidant response element-mediated 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induction of human NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 gene expression. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1999;58(10):1649–1655. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295299002452>
159. Parkinson A. *Biotransformation of Xenobiotics*. In: Doull's C&, editor. *Toxicology, The Basic Science of Poisons*. 6th ed. Curtis D. Klaassen; 2001.
160. Penning T. Molecular Endocrinology of Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Endocr Rev*. 1997;18(3):281–305.
161. W. D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47–95.

162. Lushchak VI, Bagnyukova T V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2006;144(3):283–9.
163. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann Bot [Internet]*. 2003;91:179–94. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
164. Hermes-Lima M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. *Funct Metab [Internet]*. 2005;5(December 2004):319–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2854296%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1002/047167558X.ch12%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1002/047167558X.ch12>
165. Abele D, Roecken D, Graeve M, Buck BH. Body growth, mitochondrial enzymatic capacities and aspects of the antioxidant system and redox balance under calorie restriction in young turbot (*Scophthalmus maximus*, L.). *Aquac Res*. 2007;38(5):467–77.
166. Zieliński H, Honke J, Troszyńska A, Kozłowska H. Reduced-oxidized glutathione status as a potential index of oxidative stress in mature cereal grain. *Cereal Chem*. 1999;76(6):944–8.
167. Stoliar OB, Lushchakn VI. Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. In: Lushchak V, editor. *Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants [Internet]*. Rijeka, Croatia: InTech; 2012. p. 131–66. Available from: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-environmental-induction-and-dietary-antioxidants/environmental-pollution-and-oxidative-stress-in-fish>
168. Jos Á, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno I, et al. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol*. 2005;72(3):261–71.
169. Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S. Biomarkers of oxidative stress: A comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ*. 2003;309(1–3):105–15.
170. Saumya SM, Sreejith P, Vijayasree AS, Divya L, Manju M, Oommen O V. Tri-iodo thyronine regulates antioxidant enzyme activities in different cell fractions through a mechanism sensitive to actinomycin D in a teleost, *Anabas testudineus* (Bloch). *Indian J Exp Biol*. 2006;44(8):640–6.
171. Zhao C, Feng B, Cao Y, Xie P, Xu J, Pang Y, et al. Identification and characterisation of ROS modulator 1 in *Lampetra japonica*. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;35(2):278–83.
172. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1–40.
173. Montesinos VN, Sleiman M, Cohn S, Litter MI, Destailats H. Detection and quantification of reactive oxygen species (ROS) in indoor air. *Talanta [Internet]*. 2015;138:20–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.015>
174. McCord JM, Fricovich I. Superoxide Dismutase, An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244:6049–55.
175. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*. 1992 [Internet]. 275(3–6):257–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90030-S](http://dx.doi.org/10.1016/0921-8734(92)90030-S)
176. Viña J, Borras C, Abdelaziz KM, Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC. The Free Radical Theory of Aging Revisited: The Cell Signaling Disruption Theory of Aging. *Antioxid Redox Signal [Internet]*. 2013;19(8):779–87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3749699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
177. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38388–93.
178. Stara A, Machova J, Velisek J. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ Toxicol Pharmacol [Internet]*. 2012;33(2):334–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.019>
179. Hewitt J, Morris JG. Superoxide dismutase in some obligately anaerobic bacteria. *FEBS Letters*. 1974;50(3):315–8.
180. Gregory EM, Yost FJ, Fridovich I. Superoxide Dismutases of *Escherichia coli* : Intracellular Localization

- and Functions. *J Bacteriol.* 1973;115(3):987–91.
181. Vance G, Vance G, Keele B, Keele B, Rajagopalan V, Rajagopalan V. Superoxide Dismutase from *Streptococcus*. *The Journal of Biological Chemistry.* 1972;247(15):4782–6.
182. Gosciniak SA, Fridovich I. The purification and properties of superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys - Enzymol* [Internet]. 1972;289(2):276–83. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/005-2744\(72\)90078-2](http://dx.doi.org/10.1016/005-2744(72)90078-2)
183. Peterman EM, Sullivan C, Goody MF, Rodriguez-Nunez I, Yoder JA, Kim CH. Neutralization of mitochondrial superoxide by superoxide dismutase 2 promotes bacterial clearance and regulates phagocyte numbers in zebrafish. *Infect Immun.* 2015;83(1):430–40.
184. Villafranca JJ. EPR Spectra of Fe(III)-Superoxide dismutase with special reference to the electron spin relaxation time of Fe(III). *FEBS Lett* [Internet]. 1976;62(2):230–2. Available from: http://ac.els-cdn.com/0014579376800592/1-s2.0-0014579376800592-main.pdf?_tid=286491ce-dd75-11e6-b6fc-00000aab0f6c&acdnat=1484740774_fdf8aa0a1e40d98ed9db279376be8921
185. Xing H, Li S, Wang Z, Gao X, Xu S, Wang X. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2012;103(1):74–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.007>
186. Jiang J, Gu X, Song R, Zhang Q, Geng J, Wang X, et al. Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology.* 2011;20(5):1000–9.
187. Turton HE, Dawes IW, Grant CM. *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. *J Bacteriol.* 1997;179(4):1096–101.
188. Mendes R, Cardoso C, Pestana C. Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chem.* 2009;112(4):1038–45.
189. Badran EG, Abogadallah GM, Nada RM, Nemat Alla MM. Role of glycine in improving the ionic and ROS homeostasis during NaCl stress in wheat. *Protoplasma.* 2015;252(3):835–44.
190. Carvan MJ, Di Giulio RT. Oxidative Stress Response in Aquatic and Marine Fishes. In: *Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology.* 2015. p. 481–93.
191. Favret KP. Detection of stress biomarkers in sperm, embryonic, and early larval stages of aquatic invertebrates following pesticide exposure. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2009.
192. Storey KB. Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Brazilian J Med and Biol Res.* 1996;29(January 1997):1715–33.
193. Prieto AI, Jos Á, Pichardo S, Moreno I, Cameán AM. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat Toxicol.* 2006;77(3):314–21.
194. Vieira CED, Almeida MD, Galindo B a, Pereira L, Martinez CBD. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotrop Ichthyol.* 2014;12(1):153–64.
195. Al-Ghais SM, Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Machado AL, Koba O, et al. Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. *Bull Environ Contam Toxicol* [Internet]. 2014;74(1):178–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.07.002>
196. Fernandes D, Zanuy S, Bebianno MJ, Porte C. Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. *Environ Pollut.* 2008;152(1):138–46.
197. Gravato C, Guimarães L, Santos J, Faria M, Alves A, Guilhermino L. Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*Anguilla anguilla*) from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010;73(4):524–33.
198. Ahmad I, Pacheco M, Santos MA. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere.* 2006;65(6):952–62.
199. Resende PC, Resende P, Pardal M, Almeida S, Azeiteiro U. Use of biological indicators to assess water quality of the UI River (Portugal). *Environ Monit Assess.* 2010;170(1–4):535–44.

200. Cerejeira MJ, Viana P, Batista S, Pereira T, Silva E, Valério MJ, et al. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Res.* 2003;37(5):1055–63.
201. Dagnac T, Garcia-Chao M, Fernandez-Alvarez M, Castro-Insua J, Isabel Garcia-Pomar M, Llompart M. Study of the presence of priority pesticides in surface water of river basins located in two areas of intensive dairy farming in the NW Spain (Galicia). *Int J Environ Anal Chem.* 2012;92(8):995–1011.
202. Hu M, Hu N, Ding D, Zhao W, Feng Y, Zhang H, et al. Developmental toxicity and oxidative stress induced by gamma irradiation in zebrafish embryos. *Radiat Environ Biophys* [Internet]. 2016;55(4):441–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00411-016-0663-4>
203. Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos Á, María Cameán A. Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011;74(6):1567–72.
204. Araújo MJ, Reis P, Braga AC, Antunes C. Metal levels and accumulation patterns of sea lamprey ammocoetes (*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758) from a tidal freshwater habitat. *Ann Limnol - Int J Limnol* [Internet]. 2013;49(2):107–12. Available from: <http://www.limnology-journal.org/10.1051/limn/2013044>
205. Ortiz-Ordoñez E, Uría-Galicia E, Ruiz-Picos RA, Sánchez Duran AG, Hernández Trejo Y, Sedeño-Díaz JE, et al. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2011;61(3):443–52.
206. Livingstone DR. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol.* 1998;120(1):43–9.
207. Celander M, Forlin L. Catalytic activity and immunochemical quantification of hepatic (*Oncorhynchus mykiss*). 1991;197.
208. Livingstone DR, Mitchelmore CL, O'Hara SCM, Lemaire P, Sturve J, Forlin L. Increased potential for NAD(P)H-dependent reactive oxygen species production of hepatic subcellular fractions of fish species with in vivo exposure to contaminants. *Mar Environ Res.* 2000;50(1–5):57–60.
209. Paul-Pont I, De Montaudouin X, Gonzalez P, Jude F, Raymond N, Paillard C, et al. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. *Environ Pollut* [Internet]. 2010;158(11):3401–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.028>
210. Facey DE, Blazer VS, Gasper MM, Turcotte CL. Using fish biomarkers to monitor improvements in environmental quality. *J Aquat Anim Health* [Internet]. 2005;17(3):263–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1577/H04-055.1>
211. Regoli F, Giuliani ME, Benedetti M, Arukwe A. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat Toxicol* [Internet]. 2011;105(3–4 Suppl.):56–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.014>
212. Santos JM, Godinho F, Ferreira MT, Cortes R. The organisation of fish assemblages in the regulated Lima basin, Northern Portugal. *Limnologica.* 2004;34(3):224–35.
213. Bacanskas LR, Whitaker J, Di Giulio RT. Oxidative stress in two populations of killifish (*Fundulus heteroclitus*) with differing contaminant exposure histories. *Mar Environ Res.* 2004;58(2–5):597–601.
214. Tkachenko H, Kurhaluk N, Grudniewska J. Oxidative stress biomarkers in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Disinfectant-CIP formulated with peracetic acid and hydrogen peroxide. *Arch Polish Fish* [Internet]. 2014;22(3):207–19. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/aopf.2014.22.issue-3/aopf-2014-0021/aopf-2014-0021.xml>
215. Rana SVS, Singh R, Verma S. Mercury-induced lipid peroxidation in the liver, kidney, brain and gills of a fresh water fish, *Channa punctatus*. *Japanese Journal of Ichthyology.* 1995;42:255–9.
216. De Oliveira UO, Da Rosa Araújo AS, Belló-Klein A, Da Silva RSM, Kucharski LC. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol.* 2005;140(1):51–7.
217. Nascimento CRB, Souza MM, Martinez CBR. Cooper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol - Part C Toxicol Pharmacol.*

- 2012;(155):456–61.
218. Tu HT, Silvestre F, Meulder B De, Thome J, Thanh N, Kestemont P. Combined effects of deltamethrin , temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere* [Internet]. 2012;86(1):83–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.022>
219. Rodrigues E, Oliveira MF, Nohome C, Suda K, Vani GS. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* to sewage pollution. *Fish Physiol Biochem*. 2015;1–31.
- 219.1 Howard CL, Hacker CS. Effects of Salinity, Temperature, and Cadmium on Cadmium-binding Protein in the Grass Shrimp, *Plaesomonetes pugio*. *Arch. Environ. Contain. Toxicol*. 1990;19:341–347.
220. Brecken-Folse J, Mayer FL, Pedigo LE, Marking LL. Acute toxicity of 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, terbufos and trichlorfon to grass shrimp (*Palaemonetes* spp.) and sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) as affected by salinity and temperature. *Environ Toxicol Chem*. 1994;13(1):63–77.
221. Wang Y, Li Z, Li J, Duan Y, Niu J, Wang J, et al. Fish & Shellfish Immunology Effects of dietary chlorogenic acid on growth performance , antioxidant capacity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and combined stress of low-salinity and nitrite. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2015;43(2):337–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.008>
222. Danion M, Floch S Le, Lamour F, Quentel C. EROD activity and antioxidant defenses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after an in vivo chronic hydrocarbon pollution followed by a post - exposure period. 2015;1–23.
223. Cıkıkcıoğlu N, Yıldıırım N. Use of acetylcholinesterase , glutathione S -transferase and cytochrome P450 1A1 in *Capoeta umbla* as biomarkers for monitoring of pollution in Uzuncayır Dam Lake (Tunceli , Turkey). *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2014;37(3):1169–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.001>
224. Guidelines for drinking-water Quality W. Health criteria and other supporting information. 2nd ed. WHO, editor. Vol. 2, World Health Organization. Geneva; 2003.
225. Royal Society of Chemistry. The Merck Index [Internet]. 15th ed. RSCPublishing; 2013. 2708 p. Available from: <https://www.rsc.org/merck-index>
226. Rusiecki JA, De Roos A, Lee WJ, Dosemeci M, Lubin JH, Hoppin JA, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to Atrazine in the agricultural health study. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(18):1375–82.
227. Friedmann AS. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod Toxicol*. 2002;16(3):275–9.
228. Paulino MG, Sakuragui MM, Fernandes MN. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* [Internet]. 2012;86(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.033>
229. Brodeur JC, Svartz G, Perez-Coll CS, Marino DJG, Herkovits J. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: Non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquat Toxicol*. 2009;91(2):161–70.
230. Prade L, Huber R, Bieseler B. Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase – explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure* [Internet]. 1998;6(11):1445–52. Available from: <http://biomednet.com/elecret/0969213600601445>
231. Solomon KR, Giesy JP, Lapoint TW, Giddings JM, Richards RP. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem*. 2013;32(1):10–1.
232. Van Der Kraak GJ, Hosmer AJ, Hanson ML, Kloas W, Solomon KR. Effects of atrazine in fish, amphibians, and reptiles: an analysis based on quantitative weight of evidence. [Internet]. Vol. 44 Suppl 5, *Critical reviews in toxicology*. 2014. 1-66 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25375889>
233. Hayes TB, Anderson LL, Beasley VR, Solla SR, Iguchi T, Ingraham H, Kestemont P, Kniewald J, Kniewald Z, Langlois VS, Luque EH, McCoy KA, Muñoz-de-Toro M, Oka T, Oliveira CA, Orton F, Ruby Sylvia, Suzawa M, Tavera-Mendoza LE, Trudeau VL, Victor-Costa AB, Willingham E. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(0):64–73. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.015.

234. Comissão Europeia. Decisão da Comissão relativa à não inclusão da substância activa atrazina no anexo I da Directiva 91/414/CEE do Conselho e à retirada das autorizações dos produtos fitofarmacêuticos que a contenham [Internet]. Jornal Oficial da União Europeia 2004 p. 53–5. Available from: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2004.078.01.0053.01.ENG
235. Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environmetal Int.* 2001;26:483–95.
236. Singh NP, Singh UP, Singh B, Price RL, Nagarkatti M, Prakash S. Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Leads to Reciprocal Epigenetic Regulation of FoxP3 and IL-17 Expression and Amelioration of Experimental Colitis. 2011;6(8).
237. Decreto-Lei n° 306/2007. Decreto-Lei n.º 306/2007 do Ministério Do Ambiente , Do Ordenamento Do Território E Do Desenvolvimento Regional de 27 de Agosto sobre a regulação da qualidade da água utilizada para consumo humano. *Diário da República I Série.* 2007;(164):5747–65.
238. Conselho das Comunidades Europeias. REGULAMENTO (CEE) N.º 2092/91: relativo ao modo de produção biológico de produtos agrícolas e à sua indicação nos produtos agrícolas e nos géneros alimentícios. 1998;1–65. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991R2092:20080514:PT:PDF>
239. Europeia C. Regulamento (CE) n° 746/96 que estabelece as normas de execução do Regulamento (CEE) n°2078/92 do Conselho relativo a métodos de produção agrícola compatíveis com as exigências de protecção do ambiente e à preservação do espaço natural. 1996;
240. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia. Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008 , relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/C. *Journal Oficial da União Europeia* 2008 p. 14.
241. Voogt P de. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* Springer; 2016. 123 p.
242. Hall JC, Deynze TD Van, Struger J, Chan CH. Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metochlor and 2,4-D. *J Environ Sci Heal Part B* [Internet]. 2008;28(5):577–98. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601239309372842>
243. Takacs P, Martin PA, Struger J. Pesticides in Ontario: A Critical Assessment of Potential Toxicity of Agricultural Products to Wildlife, with Consideration for Endocrine Disruption. Vol. 2. 2002.
244. CCE. Comissão das Comunidades Europeias, Estratégia temática de protecção do solo. 2002.
245. Ezemonye L, Tongo I. Lethal and Sublethal Effects of Atrazine to Amphibian Larvae. *Jordan J Biol Sci.* 2009;2(1):29–36.
246. De La Casa-Resino I, Valdehita A, Soler F, Navas JM, Pérez-López M. Endocrine disruption caused by oral administration of atrazine in European quail (*Coturnix coturnix coturnix*). *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2012;156(3–4):159–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.07.006>
247. Kolekar PD, Phugare SS, Jadhav JP. Biodegradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. BCH2 to N-isopropylammelide with subsequent assessment of toxicity of biodegraded metabolites. *Environ Sci Pollut Res.* 2014;21(3):2334–45.
248. Vidali M. Bioremediation: an overview [Internet]. Vol. X, *Biotechnology.* Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/bad0/f7c1be3580f4239df5f4c06af28470dad5df.pdf>
249. Kamrin MA, Montgomery JH. *Agrochemical and pesticide desk reference on CD-ROM.* CRC Press; 1999. 280 p.
250. Johnson WW, Finley MT. *Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates : summaries of toxicity tests conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78.* Vol. 137, Resource Publication. 1980. 106 p.
251. Renaud CB. Conservation status of Northern Hemisphere lampreys (*Petromyzontidae*). *J Appl Ichthyol.* 1997;13(3):143–8.
252. Smith AG. *Effects of Atrazine on Olfactory-mediated Behaviors in Pacific Lamprey (Entosphenus tridentatus).* Vol. 1. Oregon State University; 2012.

253. Xing H, Zhang Z, Yao H, Liu T, Wang L, Xu S, et al. Chemosphere Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P450 in common carp liver. *Chemosphere* [Internet]. 2014;104:244–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.002>
254. Elia AC, Waller WT, Norton SJ. Biochemical responses of Bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2002;68(6):809–16.
255. Al-Ghais SM. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2013;74(1):183–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.005>
256. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006;64(2):178–89.
257. Almeida PR, Quintella BR, Dias NM, Andrade N. The Anadromous Sea Lamprey in Portugal: Biology and Conservation Perspectives. 2015;1:49–58.
258. Pedro S, Caçador I, Quintella BR, Lança MJ, Almeida PR. Trace element accumulation in anadromous sea lamprey spawners. *Ecol Freshw Fish*. 2014;23(2):193–207.
259. Youson JH, Potter IC. A description of the stages in the metamorphosis of the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Can J Zool*. 1979;57(1976):1808–17.
260. Snirh. Bacias Hidrográficas de Portugal Continental [Internet]. 2009 p. 2009. Available from: http://snirh.apambiente.pt/snirh/_atlasagua/galeria/mapasweb/pt/aa1002.pdf
261. Fluviatilis L, Lamprey B, Planeri L, In B, Igoe F, Quigley DTG, et al. (L.), River Lamprey Lampetra Recommendations for Conservation. Source. 2004;56:43–56.
262. Instituto de Meteorologia IP. Boletim Climatológico Mensal [Internet]. Available from: <http://www.meteo.pt>
263. CEN. Water quality, sampling fish with electricity. 2003.
264. Proteção dos animais utilizados para fins científicos, Decreto-Lei nº113/2013. Portugal; 2004 p. 2699–700.
265. Karachle PK, Stergiou KI. Morphometrics and Allometry in Fishes. In: Wahl C, editor. Morphometrics [Internet]. INTECH; 2012. p. 65–86. Available from: <http://www.intechopen.com/books/morphometrics>
266. Wang XF, Li XQ, Leng XJ, Shan LL, Zhao JX, Wang YT. Effects of dietary cottonseed meal level on the growth, hematological indices, liver and gonad histology of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* [Internet]. 2014;428–429:79–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.040>
267. Jin S, Yan X, Zhang H, Fan W. Weight-length relationships and Fulton’s condition factors of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) in the western and central Pacific Ocean. *PeerJ* [Internet]. 2015;3:e758. Available from: <https://peerj.com/articles/758>
268. Froese R. Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *J Appl Ichthyol* [Internet]. 2006;22(4):241–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x>
269. Quintella BR, Andrade NO, Espanhol R, Almeida PR. The use of PIT telemetry to study movements of ammocoetes and metamorphosing sea lampreys in river beds. *J Fish Biol* [Internet]. 2005;66(1):97–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00584.x>
270. Mozsár A, Boros G, Sály P, Antal L, Nagy SA. Relationship between Fulton’s condition factor and proximate body composition in three freshwater fish species. *J Appl Ichthyol*. 2015;31(2):315–20.
271. Maceda-veiga A, Green AJ, Sostoa ADE. Scaled body-mass index shows how habitat quality influences the condition of four fish taxa in north-eastern Spain and provides a novel indicator of ecosystem health. 2014;1145–60.
272. Royce WF. Introduction to the Fishery Sciences. Academic Press Inc; 1972. 351 p.
273. Ricker WE. Computation and Interpretation of Biological Statistics of Fish Population. Stevenson JC, editor. Devlin, Thomas. Ottawa; 1975. 1208 p.
274. Lash LH, Qian W, Putt DA, Jacobs K, Elfarra AA, Krause RJ, et al. Glutathione conjugation of

- trichloroethylene in rats and mice: Sex-, species-, and tissue-dependent differences. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 1998;26(1):12–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1998.8402>
275. Lake B. Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies of xenobiotic metabolism. In: Snell K, Mullock B, editors. *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press; 1987. p. 183–215.
276. Sugimoto Y, Ohta Y, Morikawa T, Yamashita T, Yoshida M, Tamaoki B. In vitro metabolism of testosterone on hepatic tissue of chicken (*Gallus domesticus*). *J Steroid Biochem*. 1990;35(2):271–9.
277. Oliver H, Lowry, Nira J, Rosebrough, A, Lewis Farr and RJR. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951;193(1):265–75. Available from: http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf
278. Luke B, Loew G, AD M. Theoretical investigations of the anaerobic reduction of halogenated alkanes by cytochrome P 450. 1. Structures, inversion barriers, and heats of formation of halomethyl radicals. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1987;5(109):1307–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ja00239a004>
279. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* [Internet]. 1976;74(1):214–26. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
280. Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227–31.
281. Ohkawa H, Ohsishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* [Internet]. 1979;95(2):351–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
282. Ligor M, Olszowy P, Buszewski B. Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402(7):2233–48.
283. Bretauière J-P, Vassaut A, Amsellem L, Pourcl M-L, Thieu-Phung H, Bailly M. Criteria for Establishing a Standardized Method for Determining Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum. *Europe*. 1977;23(12):2263–74.
284. Daja A. The Impact of Enzymes in the Hepatic Function. *Int J Sci Qual Anal* [Internet]. 2015;1(1):6. Available from: <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=358&doi=10.11648/j.ijjsqa.20150101.12>
285. McCallum GP, Horton JE, Falkner KC, Bend JR. Microsomal cytochrome P450 1A1 dependent monooxygenase activity in guinea pig heart: induction, inhibition, and increase activity by addition of xogenous NADPH-cytochrome P450 reductase. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993;71:151–6.
286. Ruokolainen M, Gul T, Permentier H, Sikanen T, Kostianen R, Kotiaho T. Comparison of TiO₂ photocatalysis, electrochemically assisted Fenton reaction and direct electrochemistry for simulation of phase i metabolism reactions of drugs. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2016;83(July 2016):36–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.012>
287. Hernández-Moreno D, Soler-Rodríguez F, Míguez-Santiyán MP, Pérez-López M. Hepatic monooxygenase (CYP1A and CYP3A) and UDPGT enzymatic activities as biomarkers for long-term carbofuran exposure in tench (*Tinca tinca* L). *J Environ Sci Heal Part B* [Internet]. 2008;43(5):395–404. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601230802062117>
288. Kane AS, Kahng MW, Reimschuessel R, Nhamburo PT, Lipsky MM. UDP-Glucuronyltransferase Kinetics for 3-Trifluoromethyl-4-nitrophenol (TFM) in Fish. *Trans Am Fish Soc*. 1994;123(2):217–22.
289. Griffin MJ, Walston KK. p-Nitrophenol UDP glucuronyltransferase and epoxide hydrase in microsomes from liver rats fed 2-acetylaminofluorene and barbital. 1979;59(1):12–5.
290. Goldberg D, Spooner R. Gluathione reductase. In: Bergmeyer H-U, editor. *Methods of Enzymatic Analysis* [Internet]. 3rd ed. Academic Press; 1987. p. 258–65. Available from: <https://www.amazon.com/Methods-Enzymatic-Analysis-Hans-Urich-Bergmeyer-ebook/dp/B00I42IL5W/images/228973885.jpg#navbar>
291. Flohé L, Wingender E, Brigelius-Flohé R. Regulation of Glutathione Peroxidase. In: Forman HJ, Cadenas E, editors. *Oxidative Stress and Signal Transduction* [Internet]. 1st ed. California; 1997. p. 415–40. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5981-8_17

292. Flohé L, Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. In: Methods Enzymol [Internet]. 1984. p. 114–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659>
293. Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol. 1989;55(2):468–77.
294. Oberley L SD. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. Meth Enzym. 1984;105.:457.
295. Islinger M, Cardoso MJR, Schrader M. Be different-The diversity of peroxisomes in the animal kingdom. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]. 2010;1803(8):881–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.03.013>
296. Beers S. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem. 1952;195:133–40.
297. Sokal RR, Rohlf FJ. Introduction To Biostatistics. Second. Mineola, New York: Dover Publications, INC.; 2009:1081.
298. Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 2nd ed. 1981.
299. Siegel AF, Morgan CJ. Statistics and Data Analysis: An Introduction. John Wiley & Sons, Inc; 1996.
300. Decreto-Lei n.º 103/2010 . Decreto-Lei n.º 103/2010 do Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território de 24 de Setembro sobre a redução da poluição. Diário da República I Série. 2010;4289–96.
301. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 9: One-way analysis of variance. Crit Care [Internet]. 2004;8(2):130–6. Available from: <http://ccforum.com/content/8/2/130> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15025774> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC420045>
302. Duncan G, DeGroot MH. A mean squared error approach to design theory. In: Proceedings of the 1976 Conference on Information: Sciences and Systems. The Johns Hopkins University; 1976. p. 217–21.
303. Gomez AA, Gomez KA. Statistical procedures for agricultural research. Vol. 6, Statistical procedures for agricultural research. 1984. 680 p.
304. Hayes MC, Hays R, Rubin SP, Chase DM, Hallock M, Cook-Tabor C, et al. Distribution of Pacific Lamprey *Entosphenus tridentatus* in Watersheds of Puget Sound Based on Smolt Monitoring Data. Northwest Sci [Internet]. 2013;87(2):95–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.3955/046.087.0202>
305. Youson J, Lee J, Potter I. The distribution of fat in larval, metamorphosing, and young adult anadromous sea lampreys, *Petromyzon marinus* L. Can J Zool [Internet]. 1979;57(1):237–46. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/z79-022>
306. Sadekarpawar S, Parikh P. Gonadosomatic and Hepatosomatic Indices of Freshwater Fish *Oreochromis mossambicus* in Response to a Plant Nutrient. World J Zool. 2013;8(1):110–8.
307. Amancio AL, Silva JH, Fernandes JB, Sakomura NK, Cruz GR. Use of mathematical models in the study of bodily growth in GIFT strain Nile tilapia. Rev Ciência Agronômica [Internet]. 2014;45(2):186–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27499386>
308. Bartels H, Potter IC, Pirlich K, Mallatt J. Categorization of the mitochondria-rich cells in the gill epithelium of the freshwater phases in the life cycle of lampreys. Cell Tissue Res. 1998;291(2):337–49.
309. Haque MM, Bayachou M, Tejero J, Kenney CT, Pearl NM, Im SC, et al. Distinct conformational behaviors of four mammalian dual-flavin reductases (cytochrome P450 reductase, methionine synthase reductase, neuronal nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase) determine their unique catalytic profiles. FEBS J. 2014;281(23):5325–40.
310. Sole M, Porte C, Barcelo D. Vitellogenin Induction and Other Biochemical Responses in Carp, *Cyprinus carpio*, After Experimental Injection with 17 α -Ethinylestradiol. 2000;500:494–500.
311. Jung JH, Chae YS, Kim HN, Kim M, Yim UH, Ha SY, et al. Spatial variability of biochemical responses in resident fish after the M/V Hebei Spirit Oil Spill (Taean, Korea). Ocean Sci J. 2012;47(3):209–14.
312. Ensibi C, Daly Yahya MN, Hernández-Moreno D. Effects of Semi-Static Exposure to Carbofuran in Liver Phase I and Phase II Enzymes of Common Carp (*Cyprinus carpio*). Environ Anal Toxicol. 2015;5(3):272.
313. Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Machado AL, Koba O, Giang PT, et al. Carbendazim exposure

- induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol.* 2016;170:390–9.
314. Wilhelm Filho D, Torres MA, Zaniboni-Filho E, Pedrosa RC. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture.* 2005;244(1–4):349–57.
315. Kovačević TB, Borković SS, Pavlović SZ, Despotović SG, Saičić ZS. Glutathione as a suitable biomarker in hepatopancreas, gills and muscle of three freshwater crayfish species. *Arch Biol Sci.* 2008;60(1):59–66.
316. Mueller I a., Grim JM, Beers JM, Crockett EL, O'Brien KM. Inter-relationship between mitochondrial function and susceptibility to oxidative stress in red- and white-blooded Antarctic notothenioid fishes. *J Exp Biol.* 2011;214(22):3732–41.
317. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods.* 2005;65(2–3):45–80.
318. Ji Y, Zhang J. Biochemical Responses in Freshwater Fish *Carassius auratus* to Benzo (k) fluoranthene. (201001056):1–4.
- 318.1 Sinha ak, Elgawad HA, Giblen T, Zinta G, Rop MD, Asard H, Blust R, Boeck GD. Anti-Oxidative Defences Are Modulated Differentially in Three Freshwater Teleosts in Response to Ammonia-Induced Oxidative Stress. *PLoS ONE* 9(4): e95319. doi:10.1371/journal.pone.0095319.
319. Solovyev MM, Campoverde C, Öztürk S, Moreira C, Diaz M, Moyano FJ, et al. Morphological and functional description of the development of the digestive system in meagre (*Argyrosomus regius*): An integrative approach. *Aquaculture* [Internet]. 2016;464:381–91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004484861630357X>
320. Jiang J, Gu X, Song R. Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology.* 2011;1000–9.
321. Pimentel MS, Faleiro F, Diniz M, Machado J, Pousão-Ferreira P, Peck MA, et al. Oxidative stress and digestive enzyme activity of flatfish larvae in a changing ocean. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134082.
322. Azaza MS, Khiari N, Dhraief MN, Aloui N, Kräem MM, Elfeki A. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. *Aquac Res.* 2015;46(1):14–27.
323. Sepperumal U, Saminathan S. Antioxidant Enzymatic Response to Butylbenzylphthalate Exposures in a Fresh water Fish *Oreochromis mossambicus*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2014;3(4):1007–13.
324. McCormick SD. Methods for Nonlethal Gill Biopsy and Measurement of Na⁺, K⁺ -ATPase Activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 1993;50: 656–8. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/f93-075>

ANEXOS

Anexo A – Ensaio I

Quadro A1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biometria referente à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
TL (mm)	Entre grupos	19548,606	11	1777,146	15,269	0,000
	No interior dos grupos	54468,375	468	116,385		
	Total	74016,981	479			
TW (g)	Entre grupos	199,147	11	18,104	16,989	0,000
	No interior dos grupos	498,727	468	1,066		
	Total	697,874	479			
LW (g)	Entre grupos	0,020	11	0,002	21,564	0,000
	No interior dos grupos	0,040	468	0,000		
	Total	0,060	479			
GW (g)	Entre grupos	0,151	11	0,014	25,387	0,000
	No interior dos grupos	0,254	468	0,001		
	Total	0,405	479			
HSI	Entre grupos	3,376	11	0,307	21,847	0,000
	No interior dos grupos	6,575	468	0,014		
	Total	9,951	479			
GLSI	Entre grupos	32,521	11	2,956	26,440	0,000
	No interior dos grupos	52,330	468	0,112		
	Total	84,851	479			
K	Entre grupos	1,816	11	0,165	203,673	0,000
	No interior dos grupos	,379	468	0,001		
	Total	2,195	479			

Quadro A2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação hepáticos referente à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
Hemo (nmol/mg)	Entre grupos	11,476	11	1,043	11,121	0,000
	No interior dos grupos	4,503	48	0,094		
	Total	15,978	59			
CPR (nmol/min/mg)	Entre grupos	824,321	11	74,938	6,543	0,000
	No interior dos grupos	549,771	48	11,454		
	Total	1374,092	59			
ECOD (pmol/min/mg)	Entre grupos	15269,188	11	1388,108	14,006	0,000
	No interior dos grupos	4757,020	48	99,105		
	Total	20026,208	59			
UDPGT (pmol/min/mg)	Entre grupos	392098,681	11	35645,335	39,256	0,000
	No interior dos grupos	43585,303	48	908,027		
	Total	435683,984	59			
mGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	80227,557	11	7293,414	47,268	0,000
	No interior dos grupos	7406,304	48	154,298		
	Total	87633,861	59			
cGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	2237423,711	11	203402,156	189,647	0,000
	No interior dos grupos	51481,352	48	1072,528		
	Total	2288905,064	59			

Quadro A3 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação branquiais referente à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
UDPGT (pmol/min/mg)	Entre grupos	6671348,162	11	606486,197	24,784	0,000
	No interior dos grupos	1174580,039	48	24470,417		
	Total	7845928,200	59			
mGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	12444,988	11	1131,363	19,611	0,000
	No interior dos grupos	2769,193	48	57,692		
	Total	15214,181	59			
cGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	367129,354	11	33375,396	24,186	0,000
	No interior dos grupos	66236,726	48	1379,932		
	Total	433366,080	59			

Quadro A4 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes hepáticos referente à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	189747,403	11	17249,764	7,046	0,000
	No interior dos grupos	117520,204	48	2448,338		
	Total	307267,608	59			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	252484,307	11	22953,119	14,944	0,000
	No interior dos grupos	73723,594	48	1535,908		
	Total	326207,900	59			
GSH+GSSG	Entre grupos	621896,790	11	56536,072	9,530	0,000
	No interior dos grupos	284770,439	48	5932,717		
	Total	906667,230	59			
GSH/GSSG	Entre grupos	6,204	11	0,564	13,433	0,000
	No interior dos grupos	2,015	48	0,042		
	Total	8,220	59			
ROS (μ mol/g)	Entre grupos	594019,735	11	54001,794	13,064	0,000
	No interior dos grupos	198410,536	48	4133,553		
	Total	792430,271	59			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	604973,585	11	54997,599	68,519	0,000
	No interior dos grupos	38527,559	48	802,657		
	Total	643501,144	59			
GR (nmol/min/mg)	Entre grupos	472,658	11	42,969	7,390	0,000
	No interior dos grupos	279,081	48	5,814		
	Total	751,739	59			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	4730537598,379	11	430048872,580	24,313	0,000
	No interior dos grupos	849014495,911	48	17687801,998		
	Total	5579552094,291	59			
G6PD (nmol/min/mg)	Entre grupos	253,885	11	23,080	55,685	0,000
	No interior dos grupos	19,895	48	0,414		
	Total	273,780	59			
CTT1 (μ mol/min/mg)	Entre grupos	955,613	11	86,874	45,885	0,000
	No interior dos grupos	90,877	48	1,893		
	Total	1046,490	59			

Quadro A5 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes branquiais referentes à caracterização da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Minho, Lima, Vouga e Mondego (Ensaio I).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	353727,253	11	32157,023	5,970	0,000
	No interior dos grupos	258551,458	48	5386,489		
	Total	612278,711	59			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	466900,123	11	42445,466	10,176	0,000
	No interior dos grupos	200210,259	48	4171,047		
	Total	667110,381	59			
GSH+GSSG	Entre grupos	1550042,372	11	140912,943	8,857	0,000
	No interior dos grupos	763670,435	48	15909,801		
	Total	2313712,807	59			
GSH/GSSG	Entre grupos	1,373	11	0,125	2,310	0,023
	No interior dos grupos	2,594	48	0,054		
	Total	3,967	59			
ROS (μ mol/g)	Entre grupos	8759064,637	11	796278,603	23,052	0,000
	No interior dos grupos	1658082,651	48	34543,389		
	Total	10417147,288	59			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	266762,368	11	24251,124	71,949	0,000
	No interior dos grupos	16178,976	48	337,062		
	Total	282941,344	59			
GR (nmol/min/mg)	Entre grupos	1065,504	11	96,864	10,872	0,000
	No interior dos grupos	427,668	48	8,910		
	Total	1493,171	59			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	1185726,290	11	107793,299	38,432	0,000
	No interior dos grupos	134628,083	48	2804,752		
	Total	1320354,373	59			
G6PD (nmol/min/mg)	Entre grupos	296,475	11	26,952	36,406	0,000
	No interior dos grupos	35,536	48	0,740		
	Total	332,011	59			
CTT1 (μ mol/min/mg)	Entre grupos	103,711	11	9,428	10,907	0,000
	No interior dos grupos	41,492	48	,864		
	Total	145,202	59			

Anexo B – Ensaio II**Quadro B1** – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biometria referente à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
TL (mm)	Entre grupos	6122,736	13	470,980	2,729	0,001
	No interior dos grupos	94236,091	546	172,594		
	Total	100358,827	559			
TW (g)	Entre grupos	58,242	13	4,480	4,364	0,000
	No interior dos grupos	560,528	546	1,027		
	Total	618,770	559			
LW (g)	Entre grupos	0,006	13	0,000	4,347	0,000
	No interior dos grupos	0,053	546	0,000		
	Total	0,059	559			
GW (g)	Entre grupos	0,091	13	0,007	10,355	0,000
	No interior dos grupos	0,370	546	0,001		
	Total	0,461	559			
HSI	Entre grupos	0,888	13	0,068	3,247	0,000
	No interior dos grupos	11,480	546	0,021		
	Total	12,367	559			
GLSI	Entre grupos	22,827	13	1,756	8,391	0,000
	No interior dos grupos	114,256	546	0,209		
	Total	137,083	559			
K	Entre grupos	0,182	13	0,014	4,699	0,000
	No interior dos grupos	1,625	546	0,003		
	Total	1,806	559			

Quadro B2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação hepáticos referente à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
ALP (nmol/min/mg)	Entre grupos	0,873	15	0,058	1,357	0,197
	No interior dos grupos	2,746	64	0,043		
	Total	3,619	79			
Hemo (nmol/mg)	Entre grupos	25,254	15	1,684	6,236	0,000
	No interior dos grupos	17,279	64	0,270		
	Total	42,532	79			
CPR (nmol/min/mg)	Entre grupos	243,585	15	16,239	8,058	0,000
	No interior dos grupos	128,972	64	2,015		
	Total	372,556	79			
ECOD (pmol/min/mg)	Entre grupos	9336,072	15	622,405	10,741	0,000
	No interior dos grupos	3708,745	64	57,949		
	Total	13044,817	79			
UDPGT (pmol/min/mg)	Entre grupos	92733,974	15	6182,265	25,469	0,000
	No interior dos grupos	15535,120	64	242,736		
	Total	108269,094	79			
mGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	130,005	15	8,667	4,922	0,000
	No interior dos grupos	112,705	64	1,761		
	Total	242,710	79			
cGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	95729,973	15	6381,998	16,369	0,000
	No interior dos grupos	24952,543	64	389,883		
	Total	120682,516	79			

Quadro B3 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação branquiais referente à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
ALP (pmol/min/mg)	Entre grupos	0,312	15	0,021	3,296	0,000
	No interior dos grupos	0,404	64	0,006		
	Total	0,716	79			
UDPGT (pmol/min/mg)	Entre grupos	1803829,922	15	120255,328	15,199	0,000
	No interior dos grupos	506371,931	64	7912,061		
	Total	2310201,853	79			
mGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	120525,989	15	8035,066	16,870	0,000
	No interior dos grupos	30483,077	64	476,298		
	Total	151009,066	79			
cGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	27160,461	15	1810,697	6,404	0,000
	No interior dos grupos	18095,409	64	282,741		
	Total	45255,870	79			

Quadro B4 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes hepáticos referente à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	120778,848	15	8051,923	7,783	0,000
	No interior dos grupos	66208,730	64	1034,511		
	Total	186987,578	79			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	457246,572	15	30483,105	18,737	0,000
	No interior dos grupos	104122,020	64	1626,907		
	Total	561368,592	79			
GSH+GSSG	Entre grupos	967566,976	15	64504,465	16,172	0,000
	No interior dos grupos	255267,230	64	3988,550		
	Total	1222834,206	79			
GSH/GSSG	Entre grupos	1,081	15	0,072	3,614	0,000
	No interior dos grupos	1,276	64	0,020		
	Total	2,356	79			
ROS (μ mol/g)	Entre grupos	1422058,632	15	94803,909	3,314	0,000
	No interior dos grupos	1830935,911	64	28608,374		
	Total	3252994,543	79			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	17735,000	15	1182,333	4,854	0,000
	No interior dos grupos	15587,512	64	243,555		
	Total	33322,512	79			
GR (nmol/min/mg)	Entre grupos	738,939	15	49,263	5,526	0,000
	No interior dos grupos	570,569	64	8,915		
	Total	1309,508	79			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	167761,499	15	11184,100	5,646	0,000
	No interior dos grupos	126766,759	64	1980,731		
	Total	294528,258	79			
G6PD (nmol/min/mg)	Entre grupos	414,513	15	27,634	17,501	0,000
	No interior dos grupos	101,059	64	1,579		
	Total	515,571	79			
SOD1 (U/mg)	Entre grupos	11,847	15	0,790	1,764	0,060
	No interior dos grupos	28,657	64	0,448		
	Total	40,504	79			
CTT1 (μ mol/min/mg)	Entre grupos	3998,841	15	266,589	27,257	0,000
	No interior dos grupos	625,964	64	9,781		
	Total	4624,805	79			

Quadro B5 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes branquiais referentes à caracterização detalhada da resposta à salinidade por juvenis de lampreia-marinha das bacias do Lima e Vouga (Ensaio II).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	838886,972	15	55925,798	21,336	0,000
	No interior dos grupos	167756,983	64	2621,203		
	Total	1006643,954	79			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	434846,693	15	28989,780	7,064	0,000
	No interior dos grupos	262639,743	64	4103,746		
	Total	697486,436	79			
GSH+GSSG	Entre grupos	2146258,572	15	143083,905	14,757	0,000
	No interior dos grupos	620563,610	64	9696,306		
	Total	2766822,182	79			
GSH/GSSG	Entre grupos	3,341	15	0,223	11,493	0,000
	No interior dos grupos	1,240	64	0,019		
	Total	4,582	79			
ROS (µmol/g)	Entre grupos	5596545,656	15	373103,044	4,394	0,000
	No interior dos grupos	5434398,018	64	84912,469		
	Total	11030943,675	79			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	5975,393	15	398,360	3,295	0,000
	No interior dos grupos	7736,440	64	120,882		
	Total	13711,833	79			
GR (nmol/min/mg)	Entre grupos	298,614	15	19,908	1,424	0,163
	No interior dos grupos	894,444	64	13,976		
	Total	1193,058	79			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	385824,276	15	25721,618	10,225	0,000
	No interior dos grupos	161002,452	64	2515,663		
	Total	546826,728	79			
G6PD (nmol/min/mg)	Entre grupos	487,514	15	32,501	3,939	0,000
	No interior dos grupos	528,016	64	8,250		
	Total	1015,530	79			
SOD1 (U/mg)	Entre grupos	53,194	15	3,546	2,974	0,001
	No interior dos grupos	76,314	64	1,192		
	Total	129,508	79			
CTT1 (µmol/min/mg)	Entre grupos	79,885	15	5,326	12,851	0,000
	No interior dos grupos	26,523	64	0,414		
	Total	106,408	79			

Anexo C – Ensaio III

Quadro C1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biometria referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
TL (mm)	Entre grupos	497,745	5	99,549	0,693	0,629
	No interior dos grupos	19388,865	135	143,621		
	Total	19886,610	140			
TW (g)	Entre grupos	5,718	5	1,144	1,454	0,000
	No interior dos grupos	106,199	135	0,787		
	Total	111,917	140	209		
LW (g)	Entre grupos	0,001	5	0,000	3,642	0,004
	No interior dos grupos	0,007	135	0,000		
	Total	0,008	140			
GW (g)	Entre grupos	0,015	5	0,003	5,970	0,000
	No interior dos grupos	0,068	135	0,001		
	Total	0,083	140			
HSI	Entre grupos	0,183	5	0,037	3,245	0,008
	No interior dos grupos	1,522	135	0,011		
	Total	1,705	140			
GLSI	Entre grupos	5,085	5	1,017	6,231	0,000
	No interior dos grupos	22,033	135	0,163		
	Total	27,117	140			
K	Entre grupos	0,007	5	0,001	1,198	0,314
	No interior dos grupos	0,151	135	0,001		
	Total	0,158	140			

Quadro C2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
ALP (nmol/min/mg)	Entre grupos	0,497	5	0,099	1,630	0,226
	No interior dos grupos	0,732	12	0,061		
	Total	1,229	17			
Hemo (nmol/mg)	Entre grupos	6,585	5	1,317	2,884	0,062
	No interior dos grupos	5,479	12	0,457		
	Total	12,063	17			
CPR (nmol/min/mg)	Entre grupos	147,352	5	29,470	5,544	0,007
	No interior dos grupos	63,784	12	5,315		
	Total	211,137	17			
ECOD (pmol/min/mg)	Entre grupos	402,495	5	80,499	0,862	0,534
	No interior dos grupos	1120,604	12	93,384		
	Total	1523,099	17			
UDPGT (pmol/min/mg)	Entre grupos	20899,393	5	4179,879	6,957	0,003
	No interior dos grupos	7209,330	12	600,777		
	Total	28108,723	17			
mGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	285,140	5	57,028	34,872	0,000
	No interior dos grupos	19,624	12	1,635		
	Total	304,764	17			
cGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	24048,728	5	4809,746	22,104	0,000
	No interior dos grupos	2611,152	12	217,596		
	Total	26659,880	17			

Quadro C3 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação branquiais referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
ALP (pmol/min/mg)	Entre grupos	0,008	5	0,002	1,390	0,295
	No interior dos grupos	0,014	12	0,001		
	Total	0,023	17			
UDPGT (pmol/min/mg)	Entre grupos	1142696,387	5	228539,277	4,374	0,017
	No interior dos grupos	626926,431	12	52243,869		
	Total	1769622,818	17			
mGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	123,523	5	24,705	1,046	0,435
	No interior dos grupos	283,315	12	23,610		
	Total	406,838	17			
cGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	5004,478	5	1000,896	11,651	0,000
	No interior dos grupos	1030,917	12	85,910		
	Total	6035,395	17			

Quadro C4 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	71739,317	5	14347,863	9,510	0,001
	No interior dos grupos	18104,579	12	1508,715		
	Total	89843,896	17			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	28367,913	5	5673,583	1,080	0,419
	No interior dos grupos	63047,646	12	5253,971		
	Total	91415,559	17			
GSH+GSSG	Entre grupos	138227,689	5	27645,538	3,396	0,038
	No interior dos grupos	97682,145	12	8140,179		
	Total	235909,834	17			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,542	5	0,108	2,008	0,150
	No interior dos grupos	0,648	12	0,054		
	Total	1,190	17			
ROS (μ mol/g)	Entre grupos	1669,375	5	333,875	1,470	0,270
	No interior dos grupos	2725,124	12	227,094		
	Total	4394,499	17			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	8302,517	5	1660,503	6,965	0,003
	No interior dos grupos	2861,031	12	238,419		
	Total	11163,548	17			
GR (nmol/min/mg)	Entre grupos	248,358	5	49,672	4,141	0,020
	No interior dos grupos	143,939	12	11,995		
	Total	392,297	17			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	17084,481	5	3416,896	7,301	0,002
	No interior dos grupos	5615,992	12	467,999		
	Total	22700,473	17			
G6PD (nmol/min/mg)	Entre grupos	17,401	5	3,480	3,330	0,041
	No interior dos grupos	12,540	12	1,045		
	Total	29,941	17			
SOD1 (U/mg)	Entre grupos	2,815	5	0,563	1,450	0,276
	No interior dos grupos	4,659	12	0,388		
	Total	7,475	17			
CTT1 (μ mol/min/mg)	Entre grupos	58,126	5	11,625	1,929	0,163
	No interior dos grupos	72,331	12	6,028		
	Total	130,457	17			

Quadro C5 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes mitocondriais hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	1725,279	5	345,056	1,394	0,294
	No interior dos grupos	2969,807	12	247,484		
	Total	4695,086	17			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	374,312	5	74,862	0,380	0,853
	No interior dos grupos	2364,631	12	197,053		
	Total	2738,943	17			
GSH+GSSG	Entre grupos	2944,948	5	588,990	1,273	0,337
	No interior dos grupos	5551,742	12	462,645		
	Total	8496,691	17			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,057	5	0,011	0,535	0,746
	No interior dos grupos	0,255	12	0,021		
	Total	0,311	17			
ROS (µmol/g)	Entre grupos	4468,954	5	893,791	7,804	0,002
	No interior dos grupos	1374,369	12	114,531		
	Total	5843,323	17			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	1017039,318	5	203407,864	5,426	0,008
	No interior dos grupos	449865,172	12	37488,764		
	Total	1466904,490	17			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	311,430	5	62,286	1,342	0,312
	No interior dos grupos	557,049	12	46,421		
	Total	868,478	17			
SOD2 (U/mg)	Entre grupos	45,461	5	9,092	4,928	0,011
	No interior dos grupos	22,141	12	1,845		
	Total	67,602	17			

Quadro C6 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes branquiais referentes à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	425391,050	5	85078,210	35,402	0,000
	No interior dos grupos	28838,829	12	2403,236		
	Total	454229,879	17			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	59101,424	5	11820,285	2,613	0,080
	No interior dos grupos	54288,398	12	4524,033		
	Total	113389,822	17			
GSH+GSSG	Entre grupos	712046,690	5	142409,338	21,057	0,000
	No interior dos grupos	81157,697	12	6763,141		
	Total	793204,387	17			
GSH/GSSG	Entre grupos	2,287	5	0,457	3,418	0,038
	No interior dos grupos	1,606	12	0,134		
	Total	3,892	17			
ROS (µmol/g)	Entre grupos	135664,550	5	27132,910	6,749	0,003
	No interior dos grupos	48243,951	12	4020,329		
	Total	183908,501	17			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	1124,606	5	224,921	6,331	0,004
	No interior dos grupos	426,328	12	35,527		
	Total	1550,934	17			
GR (nmol/min/mg)	Entre grupos	50,944	5	10,189	0,562	0,728
	No interior dos grupos	217,741	12	18,145		
	Total	268,685	17			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	29701,718	5	5940,344	3,324	0,041
	No interior dos grupos	21443,332	12	1786,944		
	Total	51145,050	17			
G6PD (nmol/min/mg)	Entre grupos	84,990	5	16,998	4,956	0,011
	No interior dos grupos	41,154	12	3,429		
	Total	126,144	17			
SOD1 (U/mg)	Entre grupos	1,232	5	0,246	0,913	0,504
	No interior dos grupos	3,238	12	0,270		
	Total	4,470	17			
CTT1 (µmol/min/mg)	Entre grupos	1,543	5	0,309	7,068	0,003
	No interior dos grupos	0,524	12	0,044		
	Total	2,067	17			

Quadro C7 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes mitocondriais branquiais referentes à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente dulçaquícola (Ensaio III).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	4974,000	5	994,800	2,811	0,066
	No interior dos grupos	4246,143	12	353,845		
	Total	9220,144	17			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	3445,265	5	689,053	4,032	0,022
	No interior dos grupos	2050,904	12	170,909		
	Total	5496,169	17			
GSH+GSSG	Entre grupos	16435,977	5	3287,195	3,525	0,034
	No interior dos grupos	11189,649	12	932,471		
	Total	27625,627	17			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,073	5	0,015	0,374	0,857
	No interior dos grupos	0,471	12	0,039		
	Total	0,545	17			
ROS (μ mol/g)	Entre grupos	8852,649	5	1770,530	12,375	0,000
	No interior dos grupos	1716,873	12	143,073		
	Total	10569,522	17			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	87120,532	5	17424,106	18,276	0,000
	No interior dos grupos	11440,635	12	953,386		
	Total	98561,167	17			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	1104,657	5	220,931	3,750	0,028
	No interior dos grupos	706,900	12	58,908		
	Total	1811,557	17			
SOD2 (U/mg)	Entre grupos	24,360	5	4,872	1,302	0,326
	No interior dos grupos	44,907	12	3,742		
	Total	69,267	17			

Anexo D – Ensaio IV

Quadro D1 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biometria referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
TL (mm)	Entre grupos	91,119	3	30,373	0,413	0,744
	No interior dos grupos	11470,075	156	73,526		
	Total	11561,194	159			
TW (g)	Entre grupos	1,765	3	0,588	0,901	0,442
	No interior dos grupos	101,900	156	0,653		
	Total	103,665	159			
LW (g)	Entre grupos	0,000	3	0,000	1,538	0,207
	No interior dos grupos	0,010	156	0,000		
	Total	0,011	159			
GW (g)	Entre grupos	0,004	3	0,001	4,641	0,004
	No interior dos grupos	0,050	156	0,000		
	Total	0,055	159			
HSI	Entre grupos	0,404	3	0,135	5,967	0,001
	No interior dos grupos	3,517	156	0,023		
	Total	3,920	159			
GLSI	Entre grupos	3,076	3	1,025	8,110	0,000
	No interior dos grupos	19,726	156	0,126		
	Total	22,803	159			
K	Entre grupos	0,104	9	0,012	7,935	0,000
	No interior dos grupos	0,423	291	0,001		
	Total	0,527	300			

Quadro D2 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
ALP (nmol/min/mg)	Entre grupos	0,071	3	0,024	0,344	0,794
	No interior dos grupos	1,094	16	0,068		
	Total	1,165	19			
Hemo (nmol/mg)	Entre grupos	0,299	3	0,100	0,424	0,738
	No interior dos grupos	3,756	16	0,235		
	Total	4,054	19			
CPR (nmol/min/mg)	Entre grupos	27,026	3	9,009	1,760	0,195
	No interior dos grupos	81,897	16	5,119		
	Total	108,924	19			
ECOD (pmol/min/mg)	Entre grupos	271,264	3	90,421	3,613	0,036
	No interior dos grupos	400,395	16	25,025		
	Total	671,659	19			
UDPGT (pmol/min/mg)	Entre grupos	576919,631	3	192306,544	4,917	0,013
	No interior dos grupos	625726,312	16	39107,894		
	Total	1202645,942	19			
mGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	1824,899	3	608,300	3,501	0,040
	No interior dos grupos	2780,037	16	173,752		
	Total	4604,936	19			
cGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	1244,815	3	414,938	4,932	0,013
	No interior dos grupos	1346,152	16	84,135		
	Total	2590,967	19			

Quadro D3 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de biotransformação branquiais referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
ALP (pmol/min/mg)	Entre grupos	0,052	3	0,017	2,388	0,107
	No interior dos grupos	0,115	16	0,007		
	Total	0,167	19			
UDPGT (pmol/min/mg)	Entre grupos	2149139,216	3	716379,739	20,940	0,000
	No interior dos grupos	547366,727	16	34210,420		
	Total	2696505,943	19			
mGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	304,904	3	101,635	0,960	0,436
	No interior dos grupos	1694,698	16	105,919		
	Total	1999,602	19			
cGST (nmol/min/mg)	Entre grupos	2009,634	3	669,878	0,792	0,516
	No interior dos grupos	13529,697	16	845,606		
	Total	15539,331	19			

Quadro D4 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	9916,522	3	3305,507	1,296	0,310
	No interior dos grupos	40796,849	16	2549,803		
	Total	50713,371	19			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	3779,250	3	1259,750	0,645	0,597
	No interior dos grupos	31236,386	16	1952,274		
	Total	35015,636	19			
GSH+GSSG	Entre grupos	10012,822	3	3337,607	0,576	0,639
	No interior dos grupos	92700,086	16	5793,755		
	Total	102712,908	19			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,515	3	0,172	2,092	0,142
	No interior dos grupos	1,313	16	0,082		
	Total	1,828	19			
ROS (μ mol/g)	Entre grupos	60894,931	3	20298,310	2,278	0,119
	No interior dos grupos	142589,215	16	8911,826		
	Total	203484,147	19			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	94824,586	3	31608,195	108,819	0,000
	No interior dos grupos	4647,457	16	290,466		
	Total	99472,043	19			
GR (nmol/min/mg)	Entre grupos	5,761	3	1,920	0,266	0,849
	No interior dos grupos	115,674	16	7,230		
	Total	121,434	19			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	250,894	3	83,631	0,047	0,986
	No interior dos grupos	28581,996	16	1786,375		
	Total	28832,890	19			
G6PD (nmol/min/mg)	Entre grupos	1,041	3	0,347	1,546	0,241
	No interior dos grupos	3,591	16	0,224		
	Total	4,632	19			
SOD1 (U/mg)	Entre grupos	0,536	3	0,179	0,267	0,848
	No interior dos grupos	10,705	16	0,669		
	Total	11,241	19			
CTT1 (μ mol/min/mg)	Entre grupos	3,814	3	1,271	6,048	0,006
	No interior dos grupos	3,363	16	0,210		
	Total	7,177	19			

Quadro D5 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes mitocondriais hepáticos referente à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	36,745	3	12,248	0,241	0,866
	No interior dos grupos	812,329	16	50,771		
	Total	849,074	19			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	303,795	3	101,265	7,345	0,003
	No interior dos grupos	220,580	16	13,786		
	Total	524,375	19			
GSH+GSSG	Entre grupos	505,265	3	168,422	3,175	0,053
	No interior dos grupos	848,807	16	53,050		
	Total	1354,072	19			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,607	3	0,202	1,728	0,202
	No interior dos grupos	1,875	16	0,117		
	Total	2,482	19			
ROS (µmol/g)	Entre grupos	374,273	3	124,758	1,796	0,189
	No interior dos grupos	1111,594	16	69,475		
	Total	1485,867	19			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	94647,321	3	31549,107	12,771	0,000
	No interior dos grupos	39526,250	16	2470,391		
	Total	134173,571	19			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	911,867	3	303,956	2,128	0,137
	No interior dos grupos	2285,881	16	142,868		
	Total	3197,748	19			
SOD2 (U/mg)	Entre grupos	7,824	3	2,608	1,485	0,256
	No interior dos grupos	28,094	16	1,756		
	Total	35,918	19			

Quadro D6 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes branquiais referentes à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	242285,626	3	80761,875	3,058	0,059
	No interior dos grupos	422598,535	16	26412,408		
	Total	664884,161	19			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	68532,323	3	22844,108	7,302	0,003
	No interior dos grupos	50052,463	16	3128,279		
	Total	118584,786	19			
GSH+GSSG	Entre grupos	564116,259	3	188038,753	4,869	0,014
	No interior dos grupos	617918,716	16	38619,920		
	Total	1182034,975	19			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,049	3	0,016	0,259	0,854
	No interior dos grupos	1,002	16	0,063		
	Total	1,051	19			
ROS (µmol/g)	Entre grupos	107323,875	3	35774,625	6,077	0,006
	No interior dos grupos	94195,763	16	5887,235		
	Total	201519,639	19			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	11986,220	3	3995,407	7,724	0,002
	No interior dos grupos	8276,841	16	517,303		
	Total	20263,061	19			
GR (nmol/min/mg)	Entre grupos	18,522	3	6,174	0,539	0,663
	No interior dos grupos	183,429	16	11,464		
	Total	201,951	19			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	96618,006	3	32206,002	7,147	0,003
	No interior dos grupos	72099,131	16	4506,196		
	Total	168717,137	19			
G6PD (nmol/min/mg)	Entre grupos	14,687	3	4,896	13,214	0,000
	No interior dos grupos	5,928	16	0,370		
	Total	20,614	19			
SOD (U/mg)	Entre grupos	1,049	3	0,350	0,900	0,463
	No interior dos grupos	6,213	16	0,388		
	Total	7,261	19			
CTT1 (µmol/min/mg)	Entre grupos	22,772	3	7,591	9,464	0,001
	No interior dos grupos	12,832	16	0,802		
	Total	35,604	19			

Quadro D7 – Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”) dos parâmetros de *stress* oxidativo e defesas antioxidantes mitocondriais branquiais referentes à caracterização da resposta à atrazina por juvenis de lampreia-marinha da bacia do Lima em ambiente salino (Ensaio IV).

Parâmetros	Origem de variância	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95 %)
GSH (nmol/g)	Entre grupos	6270,212	3	2090,071	12,943	0,000
	No interior dos grupos	2583,771	16	161,486		
	Total	8853,983	19			
GSSG (nmol/g)	Entre grupos	1084,937	3	361,646	8,905	0,001
	No interior dos grupos	649,797	16	40,612		
	Total	1734,734	19			
GSH+GSSG	Entre grupos	12406,751	3	4135,584	17,023	0,000
	No interior dos grupos	3887,107	16	242,944		
	Total	16293,858	19			
GSH/GSSG	Entre grupos	0,940	3	0,313	0,660	0,589
	No interior dos grupos	7,600	16	0,475		
	Total	8,540	19			
ROS (μ mol/g)	Entre grupos	8855,525	3	2951,842	8,701	0,001
	No interior dos grupos	5428,196	16	339,262		
	Total	14283,721	19			
MDA (nmol/g)	Entre grupos	1918,664	3	639,555	1,665	0,214
	No interior dos grupos	6144,114	16	384,007		
	Total	8062,779	19			
GPx (nmol/min/mg)	Entre grupos	347,831	3	115,944	8,377	0,001
	No interior dos grupos	221,443	16	13,840		
	Total	569,275	19			
SOD2 (U/mg)	Entre grupos	93,754	3	31,251	2,840	0,071
	No interior dos grupos	176,057	16	11,004		
	Total	269,811	19			