



SETAC – Brazil

Atividade de Acetilcolinesterase em *Daphnia*: Um Bom Biomarcador de Avaliação Ambiental?

L. B. PRINTES^{1*} & A. CALLAGHAN²

¹Cientistas Associados Ltda., Rua Alfredo Lopes, 1717, Vila Elisabeth, CEP 13560-460, São Carlos, SP

²School of Animal & Microbial Sciences, The University of Reading, Whiteknights P.O. Box 228, Reading, RG6 6AJ, UK

RESUMO

A atividade de acetilcolinesterase (AChE) tem sido empregada como um biomarcador de contaminação ambiental. Contudo, em relação aos invertebrados, são necessários estudos adicionais para determinar o papel desta resposta no monitoramento biológico. Sendo assim, foram realizados experimentos para avaliar a interferência de fatores ambientais e de desenvolvimento na atividade de AChE em *D. magna* e *D. similis*. Foram também investigadas as relações entre atividade de AChE, toxicidade aguda e efeitos em nível de população em *D. magna*. Uma relação inversa entre o comprimento do corpo e a atividade de AChE foi verificada para *D. magna*. Neonatas de *D. similis* (= 72 h) mantidas em água mineral diluída tiveram atividade mais baixa de AChE do que as mantidas em meio ASTM. Os resultados obtidos indicaram ainda que as associações entre atividade de AChE e efeitos em níveis mais alto de organização biológica em *D. magna* nem sempre são diretas. As razões entre EC50 e IC50 após exposição aos inseticidas propoxur, paration, malation, clorpirifós e acefato variaram de 0,31 a 0,90. Em organismos previamente expostos ao acefato foram verificadas ainda interferência do genótipo com a conexão entre efeitos sob a atividade de AChE e alterações na taxa de crescimento populacional. Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização da atividade de AChE em dafnínídeos como um biomarcador em programas de análise ambiental deve ser feita com cautela. Por um lado, esta é uma ferramenta sensível que sob condições padronizadas pode dar uma boa indicação de exposição a organofosforados e carbamatos. Por outro, a utilização desta ferramenta para antecipar efeitos em níveis mais altos de organização biológica é limitada e deve ser feita somente em conjunção com análises complementares.

Palavras-chave: colinesterases, *Daphnia*, pesticidas, toxicidade aguda, crescimento populacional.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase activity in *Daphnia*: is it a good biomarker of environmental contamination?

Acetylcholinesterase (AChE) activity has been employed as a biomarker of environmental contamination. However, for invertebrates, additional studies are required to determine the role of AChE activity in biological monitoring. Thus, a series of experiments was performed to evaluate the interference of developmental and environmental factors on AChE activity in *D. magna* and *D. similis*. In addition, the relationships between AChE activity, acute toxicity and population level effects were evaluated for *D. magna*. An inverse relationship between body length and AChE activity has been demonstrated for *D. magna*. Also, juveniles of *D. similis* (= 72 h) kept in diluted mineral water had lower AChE activity than those kept in ASTM water. Our findings have as well indicated that the associations between AChE activity and higher level effects in *D. magna* are not always straightforward. Exposure to parathion, propoxur, malathion, chlorpyrifos, and acephate resulted in the ratio between EC50 and IC50 varying from 0.31 to 0.90. Furthermore, we found that genotypic variation will interfere with the link between AChE activity and population growth rate in *D. magna* pos-exposed to acephate. Therefore, the use of this biomarker in environmental assessment programmes should be made with caution. On one hand, it is very sensitive, and keeping strict standard conditions it can give a good indication of exposure to organophosphates and carbamates. On the other hand, its use as a predictive tool is limited, and should only be made in association with complementary measurements.

Key words: cholinesterases, *Daphnia*, pesticides, acute toxicity, population growth.

* Corresponding author: Liane Biehl Printes, e-mail: printes_liane@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A medição da atividade de acetilcolinesterase (AChE) tem sido empregada com sucesso para monitorar exposição a pesticidas anticolinesterase (organofosfatos e carbamatos). Para organismos vertebrados, existe correlação direta entre o grau de inibição de acetilcolinesterase e a manifestação de efeitos tóxicos letais e subletais (Walker *et al.*, 2001). Entretanto, avaliações com invertebrados têm demonstrado que relação direta entre mudanças na atividade de AChE e toxicidade nem sempre é verificada (Day & Scott, 1990; Sturm & Hansen, 1999). Estudos envolvendo o microcrustáceo *Daphnia magna* mostram resultados controversos e que investigações adicionais são necessárias (Sturm & Hansen, 1999). Definir a extensão em que a inibição de AChE e a toxicidade estão relacionadas em invertebrados é de caráter essencial para estabelecer o papel deste biomarcador como ferramenta de avaliação ambiental (Lagadic *et al.*, 1994).

Desta forma, este estudo teve por objetivo investigar a influência de fatores ambientais e de desenvolvimento na expressão da atividade de AChE, assim como as relações entre este biomarcador e os efeitos em nível individual e populacional em organismos do gênero *Daphnia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio de acetilcolinesterase

O procedimento para a medição da atividade de acetilcolinesterase foi baseado no ensaio genérico proposto por Ellman *et al.* (1961) adaptado para uso em microplacas (Fisher *et al.*, 2000). Os homogenizados foram preparados com grupos de 10 a 20 indivíduos adultos e jovens, respectivamente (Printes, 2003).

Relação entre atividade de acetilcolinesterase e comprimento do corpo em *D. magna*

Neonatas (< 24 h) de *D. magna* (IRCHA, clone tipo 5) foram cultivadas em meio ASTM (ASTM, 1980) até seis classes de tamanho predeterminadas: 1; 1,5; 2; 2,5; 3; e 3,5 mm. Os organismos foram mantidos individualmente em 50 ml de água de cultivo e alimentados diariamente com *Chlorella vulgaris* e uma suspensão de água destilada contendo fermento biológico Fleishman®. Ao atingirem o tamanho estabelecido, os organismos foram congelados em nitrogênio líquido e preservados a -70°C para posterior avaliação da atividade de AChE.

Influência do meio de cultivo sobre a atividade de AChE em *D. similis*

Neonatas de *D. similis* (< 24 h) foram mantidas sem alimento por 48 h (5: 150 ml) em dois meios de cultura: (1) ASTM e (2) água mineral diluída (DMW) (USEPA, 1991). Os organismos foram então congelados e preservados a -70°C para avaliação da atividade de AChE.

AChE × imobilidade em 48 h

Neonatas de *D. magna* (< 24 h) foram expostas a 5 inseticidas (paration, propoxur, clorpirifós, malation e acefato). As concentrações utilizadas variaram de 2 a 17 µM, 120 a 860 µM, 0,7 a 7 µM, 4 a 24 µM e 55 µM a 1 mM para paration, propoxur, clorpirifós, malation e acefato, respectivamente. Após 48 h, foi verificada a mobilidade dos organismos e os organismos móveis foram congelados para análises de AChE. O efeito na atividade enzimática foi correlacionado com valores de EC50 previamente obtidos em testes de toxicidade convencionais.

Relação entre atividade de AChE e efeito populacional

Dois clones de *D. magna* foram selecionados: (1) IRCHA, clone tipo 5 ou “Standard”, e (2) Clone “Ruth” (Universidade de Sheffield, Inglaterra). Os organismos (15: 1000 ml) foram expostos por 7 dias a concentrações subletais de acefato (5 e 10 mg/L). Após 48 h, parte dos organismos foi congelada para a análise da atividade de AChE. No final dos 7 dias de exposição os indivíduos remanescentes foram transferidos para meio ASTM. Não foi oferecido alimento nas primeiras 48 h, e após esse período os organismos foram mantidos com *C. vulgaris* e suspensão de água destilada com fermento biológico. A taxa de crescimento populacional (PGR) foi calculada ao término de 21 dias (Sibly, 1999), e a relação entre AChE e PGR foi avaliada para os dois clones.

Análises estatísticas

Para a comparação dos tratamentos no experimento com *D. similis* em diferentes meios de cultura foi utilizado o teste “t” com nível de significância de 0,05. Os valores de IC50 foram estimados por análises de regressão não linear (SAS, versão 8.2, Instituto SAS, NC, USA), e os dados obtidos foram comparados utilizando-se teste “t” com nível de significância de 0,05. A relação entre PGR e AChE foi calculada através de análise de regressão múltipla utilizando-se S-Plus 6.1 (Insightful Corp. 2002) (Printes, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de AChE em *D. magna* apresentou relação inversa com o tamanho dos organismos ($F_{1,4} = 24,93$; $r^2 = 0,827$; $p = 0,008$) (Figura 1). De maneira similar, relação inversa entre o comprimento do corpo e a atividade de AChE tem sido demonstrada para peixes (Sturm *et al.*, 1999). A relação do tamanho dos organismos com a atividade de AChE não deve ser ignorada. Se diferentes situações são comparadas, deve-se considerar os fatores que podem afetar o crescimento e, conseqüentemente, gerar um falso efeito na atividade de AChE.

O experimento realizado com *D. similis* de dois meios de culturas apontou para variação significativa na atividade de AChE ($t_4 = 4,24$; $p = 0,013$). Os valores obtidos foram $7,15 \pm 0,60$ e $4,18 \pm 0,35$ µM/L/min/g proteína para ASTM e DMW, respectivamente.

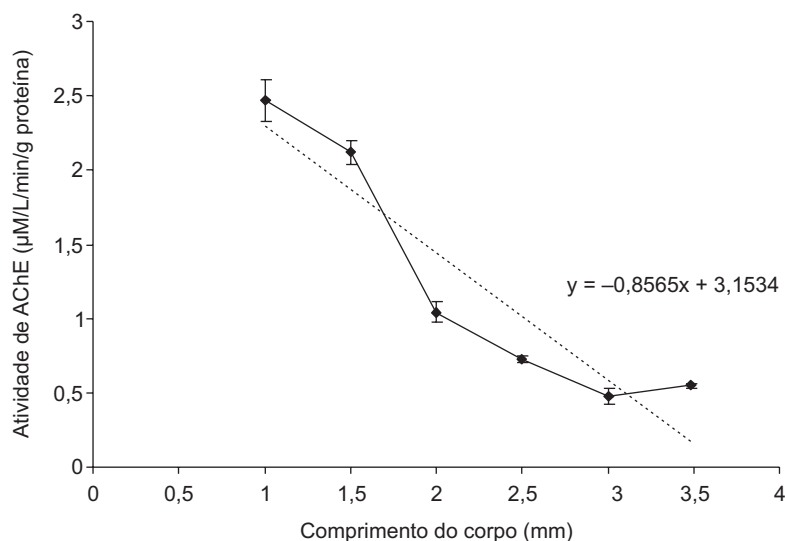


Figura 1 — Relação entre atividade de AChE e comprimento do corpo em *D. magna*.

Outros estudos têm demonstrado que a utilização de meios diferentes para o cultivo e testes de toxicidade com dafnínídeos pode causar variabilidade nas respostas desses organismos a poluentes (Guilhermino *et al.*, 1997).

Os valores de IC50 para clorpirifós e malation foram estatisticamente diferentes ($t_{25} = 6,01$). Não houve diferença significativa entre paration e clorpirifós ($t_{22} = 0,57$) e paration e malation ($t_{25} = 1,39$). Considerando-se a relação entre IC50 e EC50, a razão entre estes dois valores oscilou entre 0,31 e 0,90 (Tabela 1), o que sugere variabilidade nos níveis de AChE associados à toxicidade aguda para os diferentes pesticidas. Sturm & Hansen (1999) também encontraram variação nas relações entre inibição de AChE e imobilidade em *D. magna* e *Chironomus riparius* expostos aos organofosfatos paration e diclorvos.

Essa inconsistência entre as razões IC50/EC50 pode estar refletindo efeitos tóxicos que não estão diretamente re-

lacionados com a inibição de AChE. Os resultados obtidos indicam que o valor de utilizar AChE como um biomarcador de efeito em *D. magna* irá depender do químico avaliado.

A inibição de AChE após 48 h foi associada com um decréscimo em PGR para o clone “Standard”. De maneira inversa, a inibição de AChE foi associada com um aumento em PGR para o clone “Ruth” (Figura 2). Esses resultados sugerem a presença de interação entre genótipo (clone) e ambiente (concentração de acefato) para crescimento populacional em *D. magna*. Esses resultados talvez não sejam surpreendentes, uma vez que variações significativas entre clones de *D. magna* em relação à fecundidade e PGR já foram observadas previamente em organismos expostos a 3,4 dicloroanilina e bromato de sódio (Soares *et al.*, 1992). Vários fatores podem contribuir para estas variações, entre eles diferenças nos mecanismos de defesa utilizados para evitar exposição e variabilidade nos mecanismos de detoxificação (Baird & Barata, 1998).

Tabela 1 — Toxicidade aguda (EC50, 48 h) de diferentes inseticidas para *D. magna* e efeito sobre a atividade de acetilcolinesterase (AChE) (IC50, 48 h). Todas as concentrações em µM exceto para acefato (µM).

Inseticidas	EC50 (48 h)*	IC50 (48 h)**	IC50/EC50
Paration	7,03 (6,38-7,72)	4,19 ± 2,46	0,60
Propoxur	449,90 (370,84-572,43)	256,98 ± 51,00	0,57
Clorpirifós	3,17 (2,62-3,71)	1,40 ± 0,06	0,44
Malation	10,56 (9,99-11,47)	9,48 ± 1,30	0,90
Acefato	309,82 (262,17-370,30)	94,98 ± 5,13	0,31

* EC50 (48 h) = concentração efetiva média de testes de toxicidade padrão (limites de confiança superior e inferior de 95%); ** IC50 = concentração estimada em que a atividade de AChE é inibida em 50% (média para três réplicas ± desvio-padrão).

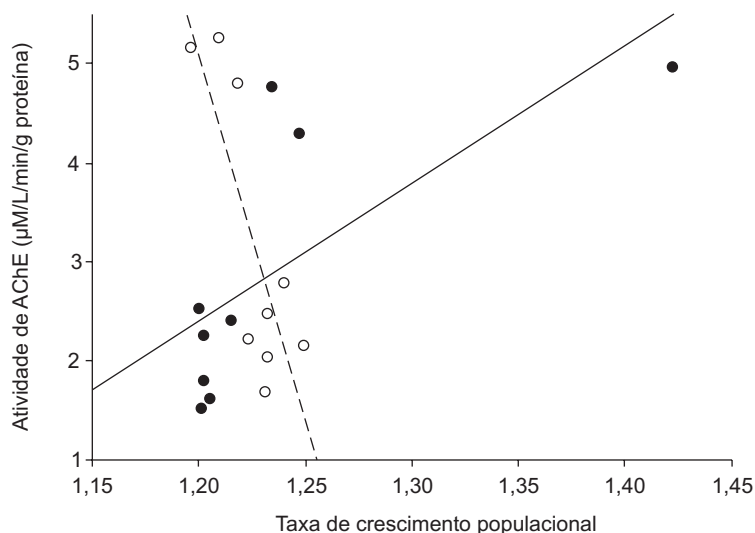


Figura 2 — Relação entre atividade de AChE e taxa de crescimento populacional para *D. magna*; ● clone Standard; ○ clone Ruth.

Além disso, é possível que efeitos secundários associados à toxicidade de organofosfatos também possam contribuir para as diferenças nas respostas individuais e populacionais observadas para os dois clones. Desta forma, a variação genética parece influenciar a relação entre a atividade de AChE e efeitos tóxicos em nível de população para *D. magna*.

Os resultados do presente estudo sugerem que, levando-se em consideração a possibilidade de variações devido a fatores ambientais e de desenvolvimento, a atividade de AChE em *Daphnia* pode ser considerada um bom biomarcador de exposição. Contudo, o uso desse biomarcador como critério para avaliação de efeitos tóxicos em níveis mais altos de organização biológica deve ser feito com cautela. Medidas de análises complementares devem também ser utilizadas.

Agradecimentos — À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTM – American Society for Testing and Materials, 1980, *Standard practice for conducting acute toxicity test with fishes, microinvertebrates and amphibians*. Philadelphia, PA, USA, Report E-790-80.
- BAIRD, D. J. & BARATA, C., 1998, Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: implications for risk assessment. In: V. E. Forbes (ed.), *Genetics and ecotoxicology*. Taylor & Francis, Philadelphia, PA.
- DAY, K. E. & SCOTT, I. M., 1990, Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat Toxicol.*, 18: 101-114.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES JR., V. A. & FEATHERSTONE, R. M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*, 7: 88-95.
- FISHER, T. C., CRANE, M. & CALLAGHAN, A., 2000, An optimized microtitreplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* meigen. *Environ Toxicol Chem.*, 19: 1749-1752.
- GUILHERMINO, L., DIAMANTINO, T. C., RIBEIRO, R., GONÇALVES, F. & SOARES, A. M. V. M., 1997, Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 38: 292-295.
- LAGADIC, L., CAQUET, T. & RAMADE, F., 1994, The role of biomarkers in environmental risk assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3: 193-208.
- PRINTES, L. B., 2003, *The value of acetylcholinesterase in Daphnia as a biomarker of environmental contamination*. Tese de Doutorado, Reading. School of Animal and Microbial Sciences, University of Reading, 238p.
- SIBLY, R. M., 1999, Efficient experimental designs for studying stress and population density in animal populations. *Ecol Appl.*, 9: 496-503.
- SOARES, A. M. V. M., BAIRD, D. J. & CALOW, P., 1992, Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* Straus in chronic bioassays. *Environ Toxicol Chem.*, 11: 1477-1483.
- STURM, A. & HANSEN, P. D., 1999, Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 42: 9-15.
- STURM, A., WOGRAM, J., HANSEN, P. D. & LIESS, M., 1999, Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small stream: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. *Environ Toxicol Chem.*, 18: 194-200.
- USEPA – U.S. Environmental Protection Agency, 1991, *Methods for measuring the acute toxicity of effluent and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4ª Edição. Washington, DC, USA. EPA – 600/4-90/027.
- WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M. & PEAKALL, D. B., 2001, *Principles of ecotoxicology*. London, UK, Taylor & Francis, 309p.