



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

RITA ALEXANDRE **Avaliação do perfil de biomarcadores enzimáticos**
PERALTA TRAVASSO **em *Sardina pilchardus***



**RITA ALEXANDRE
PERALTA TRAVASSO**

**Avaliação do perfil de biomarcadores enzimáticos
em *Sardina pilchardus***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada – Ramo Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e da Co-orientação do Doutor Bruno Branco Castro, Equiparado a Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro.

Dedico esta dissertação a todos os que me ajudaram a torná-la possível.

o júri

presidente

Doutor António José Arsénia Nogueira

Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes

Estagiária de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro

Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

Professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

Doutor Bruno Branco Castro

Equiparado a Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Fernando Gonçalves por me ter recebido na sua equipa de trabalho, por todas as condições e meios proporcionados para a realização do trabalho prático.

Ao Professor Doutor Bruno Nunes gostaria de agradecer todo o saber científico transmitido e a forma exigente e criativa de abordar os assuntos para a elaboração da presente dissertação.

Ao Doutor Bruno Castro por todo o apoio ao longo da dissertação, a disponibilidade nas saídas de campo e a compreensão na escrita. Obrigado pelo incentivo, motivação e ânimo para a conclusão desta dissertação.

A toda a equipa do LEADER pela partilha de conhecimentos e boa disposição.

À DOCAPESCA Portos e Lotas, S.A de Peniche, Aveiro e Matosinhos, por me terem fornecido as sardinhas, pois sem o material biológico, o estudo não teria sido possível realizar.

As minhas amigas de sempre, Sara e Fátima, por todo o apoio incansável. A Sara por me ter conseguido levantar o astral quando estava em baixo na escrita, no trabalho laboratorial quando estava bastante atrasada ao final do dia... A Fátima por ouvir os meus desabafos por casa, pela transmissão de conhecimentos, pelas risotas... A vizinha Catarina, por todo o apoio e amizade que me deu nestes últimos tempos de tese :) ... por tudo muito obrigado!!

À minha família, em especial, pais, irmã, cunhado e as minhas pequenitas, por todo o apoio incondicional durante esta dissertação, amizade, ajuda psicológica e sobretudo por sempre acreditarem que era capaz...

Ao Bernardo, pela paciência para me aturar e me ajudar nos piores momentos.... Obrigado :)

palavras-chave

Biomonitorização, *Sardina pilchardus*, biomarcadores, condição fisiológica e reprodutiva

resumo

As sardinhas (*Sardina pilchardus*) capturadas no Atlântico Nordeste são um recurso alimentar comum em Portugal. No entanto, o efeito de potenciais compostos antropogénicos nesta espécie nunca foi avaliado, nem tão pouco foi avaliado o eventual efeito destes compostos em sardinhas capturadas em diferentes locais da costa portuguesa. Tendo em conta a importância da sardinha para o consumo humano, torna-se relevante caracterizar as suas respostas fisiológicas à contaminação. Sendo amplamente capturadas na costa Portuguesa, é importante conhecer em detalhe os padrões de resposta de sardinha à contaminação química, bem como a variabilidade intrínseca (ex: ciclo reprodutivo e estado nutricional) e extrínseca (ex: influência de factores abióticos) dos níveis de resposta.

O presente trabalho pretendeu monitorizar mensalmente alterações fisiológicas/adaptativas de *Sardina pilchardus* no Atlântico Norte, descarregadas em três portos comerciais portugueses (Matosinhos, Aveiro e Peniche), durante um período de nove meses (Maio 2010 – Janeiro 2011). Para tal, utilizou-se uma abordagem de quantificação de biomarcadores (catalase - CAT, glutathione-S-transferase - GSTs; lactato desidrogenase - LDH; acetilcolinesterase – AChE), que foram relacionados com indicadores de estado nutricional, reprodutivo, e fisiológico (índices de condição, K, K (gut), K (liver); índice gonadossomático, GSI; índice hepatossomático, HSI). Assim, o objectivo do presente trabalho foi o de perceber de que forma o uso de biomarcadores, enquanto ferramenta de avaliação da exposição a contaminantes, é afectado pela variabilidade natural (população/zona geográfica e ciclo de vida/sazonalidade).

Os resultados apontam para alguma variação entre áreas geográficas distintas, mas o principal contributo para a variação dos dados foi a sazonalidade. Os níveis de LDH, na globalidade, foram significativamente mais elevados durante o período mais quente (Maio a Setembro), tendo a partir daí decrescido até Janeiro, ao passo que a actividade da AChE variou mensalmente, mas sem um padrão perceptível. As actividades de CAT e GSTs aumentaram gradualmente de Maio a Setembro, tendo diminuído a partir do mês de Setembro. A análise de correlação revelou uma associação significativa entre os biomarcadores e vários índices do estado fisiológico e reprodutivo. Esta associação foi consistente entre populações: a LDH pareceu estar relacionada com o factor de condição (K), ao passo que a CAT e GSTs se relacionaram com o GSI e, no caso das GSTs, também com o HSI e estado nutricional. Os dados apontam claramente para uma grande influência do ciclo reprodutivo na actividade de várias enzimas usadas como biomarcadores.

keywords

Biomonitoring, *Sardina pilchardus*, biomarkers, physiological and reproductive condition

abstract

Sardines (*Sardina pilchardus*), captured in the Northeast Atlantic, are a common food resource in Portugal. However, the effect of potential anthropogenic compounds in the species was never evaluated, nor the effect of such compounds in fish captured off the Portuguese coast. Bearing in mind the importance of sardine for human consumption, it is important to characterise their physiological responses to contamination. Thus, it seems vital to study the response patterns of sardines to chemical contamination, as well as the intrinsic (ex: reproductive cycle and nutritional state) and extrinsic (variation in abiotic factors) variability in the levels of response.

The present work intended to monitor physiological/adaptive alterations in *Sardina pilchardus* in three distinct locations in the North Atlantic, using freshly caught sardines obtained in three Portuguese fishing ports (Matosinhos, Aveiro and Peniche). This was performed on a monthly basis, for a period of nine months (May 2010 – January 2011). To do so, a biomarker approach (catalase – CAT, glutathione S-transferases – GST, lactate dehydrogenase – LDH, and acetylcholinesterase – AChE) was used, and these biochemical parameters were correlated with nutritional, reproductive, and physiological state indicators (condition factors, K, K (gut), K (liver); gonadosomatic index, GSI; hepatosomatic index, HSI). Thus, the goal of the present thesis was to understand how the use of biomarkers, as a tool in the evaluation of contaminant exposure, is affected by natural variability in sardine populations (population/geographic area and life cycle/seasonality).

Our results point towards some variation among distinct geographical areas/populations, but the main contribution in the variation of the data was due to seasonality. LDH values, overall, were significantly higher during the warmer period (May to September), decreasing from there onwards until January. AChE activity varied monthly but no consistent pattern emerged. CAT and GSTs activities gradually increased from May to September, decreasing from September onwards. Correlation analysis revealed significant associations between biomarkers and physiological and reproductive state. This association was consistent among populations: LDH was related to condition factor (K), while CAT and GSTs were correlated to GSI and, in the case of GSTs, also with HSI and nutritional state. Our data clearly point out a large influence of the reproductive cycle in the activity of several enzymes, normally used as biomarkers of environmental contamination.

Índice

Introdução

1. Introdução	3
1.1. Contaminação aquática por compostos antropogénicos	3
1.2. Avaliação de efeitos ecotoxicológicos: biomarcadores	5
1.3. Actividade de enzimas como biomarcadores	7
1.4. Variabilidade natural de parâmetros bioquímicos e fisiológicos	10
1.5. <i>Sardina pilchardus</i>	11
Objectivos da dissertação	13

Material e Métodos

2. Material e Métodos	17
2.1. Locais de amostragem	17
2.2. Estratégia de amostragem e processamento do material biológico	18
2.3. Análise enzimática	19
2.3.1. Acetilcolinesterase (AChE)	19
2.3.2. Catalase (CAT)	19
2.3.3. Glutathione-S-transferase (GSTs)	20
2.3.4. Lactato desidrogenase (LDH)	20
2.3.5. Proteína total	20
2.4. Estado nutricional, fisiológico e reprodutivo	21
2.5. Análise estatística	21

Resultados

3. Resultados	25
3.1. Biomarcadores	25
3.2. Métricas de estado nutricional, fisiológico, e reprodutivo	28
3.3. Variabilidade natural nas respostas bioquímicas	30

Discussão e Conclusões

4. Discussão e Conclusões	35
4.1. Estado nutricional, fisiológico e reprodutivo	35
4.2. Biomarcadores	37
4.3. Conclusões	40

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas	45
----------------------------	----

Introdução

1. Introdução

1.1. Contaminação aquática por compostos antropogénicos

A poluição marinha é uma preocupação global, devido aos efeitos crescentes dos contaminantes, consequência de actividades antropogénicas (Sarkar *et al.*, 2006). Deste modo, a contaminação de ambientes marinhos representa uma ameaça evidente para a saúde de vários organismos (Malins *et al.*, 2006). A intensificação das actividades antropogénicas tem contribuído para esta problemática, não só em zonas costeiras, mas também em águas marinhas longínquas (Bacelar *et al.*, 2009). Em zonas costeiras os efeitos dos contaminantes fazem-se sentir com maior intensidade devido à sua proximidade com fontes antropogénicas, mas a presença de poluentes em alto mar e em áreas remotas é também documentada, devido a correntes marítimas e ao transporte atmosférico global (Doglioli *et al.*, 2004; Solé *et al.*, 2010). As águas marinhas recebem não só nutrientes e contaminantes provenientes das actividades urbanas, agrícolas e industriais, mas também são impactadas com a exploração das zonas costeiras para a pesca, aquacultura e turismo, uma vez que os recursos da zona costeira são explorados de forma continuada e intensiva (Bacelar *et al.*, 2009).

Habitualmente, o ecossistema aquático torna-se no receptor final de contaminantes, incluindo diversas substâncias biologicamente activas, como milhares de compostos químicos orgânicos e inorgânicos sintéticos estranhos aos organismos (xenobióticos) (Newman, 2001; Van der Oost *et al.*, 2003). Contudo, nas águas marinhas, a concentração da maioria dos xenobióticos dissolvidos é baixa, possivelmente devido ao efeito de diluição. Ou seja, quando a água doce contaminada atinge o oceano, a concentração de xenobióticos diminui, pois a água flui de uma fonte pequena para um enorme reservatório (Walker *et al.*, 2001).

Actualmente os problemas ambientais são variados e complexos, sendo que um dos principais passa pela identificação e avaliação da toxicidade dos inúmeros compostos produzidos, comercializados e libertados para o ambiente, e que afectam os organismos a vários níveis (Bresler *et al.*, 1999). A utilização destes compostos nas diversas actividades antropogénicas, de forma deliberada e em larga escala, contamina directa ou indirectamente os ecossistemas, o que suscita uma grande preocupação científica em relação às espécies existentes nestes meios (Bresler *et al.*, 1999). Segundo Van der Oost *et al.* (2003), o ambiente é continuamente sujeito a xenobióticos libertados por comunidades urbanas e indústrias. Neste sentido, algumas classes de poluentes têm sido identificadas, nomeadamente, iões inorgânicos (e.g. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}), poluentes orgânicos (e.g., policlorobifenilos (PCB), pesticidas), compostos organometálicos (e.g. metilmercúrio (CH_3Hg^+), isótopos radioactivos e gases (Walker *et al.*, 2001).

Vasseur e Cossu-Leguille (2006) descrevem que os efeitos individuais que podem surgir da contaminação incluem neurotoxicidade, mudanças comportamentais, desregulação endócrina, alterações na reprodução, disfunção imunológica e genotoxicidade. A interferência na neurotransmissão pode afectar o comportamento e assim prejudicar a capacidade do organismo de se alimentar, escapar de predadores, e comunicar com parceiros sexuais, o que, ulteriormente, poderá afectar o crescimento e a reprodução (Vasseur e Cossu-Leguille, 2006). Por sua vez, os xenobióticos podem induzir lesões celulares e a disrupção endócrina, o que pode levar ao comprometimento do crescimento, desenvolvimento e/ou reprodução (Vasseur e Cossu-Leguille, 2006). A disfunção imune pode levar a um aumento de sensibilidade ao *stress* ambiental, infecção e ao parasitismo. Por fim, a genotoxicidade pode levar a mutações e o sucesso da reprodução ser comprometido. No entanto, as consequências desses efeitos tóxicos dependerão do estágio de vida das espécies expostas (Vasseur e Cossu-Leguille, 2006). Assim, devido à exposição a contaminantes e aos efeitos que podem surgir, os organismos respondem no sentido da manutenção da homeostase. No entanto, quando as respostas biológicas resultantes da exposição a contaminantes, a nível molecular e bioquímico, não são devidamente compensadas por homeostasia, poderão expressar-se a níveis superiores de um modo progressivo (Klaassen, 2001).

No meio aquático, o contacto permanente dos peixes com a água promove a absorção directa de contaminantes a partir desta ou do sedimento, através dos sistemas respiratório (via brânquias) e, em menor grau, através da pele (Walker *et al.*, 2001). A absorção pode igualmente ter lugar através do sistema digestivo por via alimentar (Klaassen, 2001). A distribuição dos contaminantes pelos tecidos após absorção é influenciada por vários processos fisiológicos e pelas propriedades químicas dos mesmos, tais como a lipofilicidade e a sua capacidade de ligação a macromoléculas (Klaassen, 2001). Os compostos químicos, aquando da sua eliminação, podem encontrar-se na sua forma parental ou ter sofrido biotransformação (Van der Oost *et al.*, 2003). A eliminação desses compostos pode ocorrer através das brânquias, pele, bÍlis e urina (Klaassen, 2001). A biotransformação de xenobióticos ocorre maioritariamente no fÍgado e rim, e em menor grau nas brânquias e mucosa intestinal (Klaassen, 2001). Os xenobióticos podem sofrer nestes Órgãos uma sÉrie de reacções sequenciais (biotransformação) conducentes à sua activação, destoxificação, acumulação e excreção (Walker *et al.*, 2001). A biotransformação pode ser compreendida como o conjunto de alterações químicas que os xenobióticos sofrem no organismo, geralmente por processos enzimáticos, com o objectivo de formar derivados mais polares e solúveis em água, resultando, quase sempre, na diminuição da toxicidade, facilitando a eliminação (De Azevedo e Chasin, 2004). No entanto, convém salientar que a biotransformação pode, em alguns casos, levar à bioactivação dos contaminantes, formando metabolitos toxicologicamente mais potentes do que os compostos parentais (Huggett *et al.*, 1992).

1.2. Avaliação de efeitos ecotoxicológicos: biomarcadores

A ocorrência de compostos tóxicos persistentes em diferentes compartimentos do meio marinho tem ameaçado a saúde deste mesmo ecossistema, devido à disponibilidade e persistência dos compostos, à acumulação em várias espécies de organismos marinhos e também da interferência dos compostos com as características bioquímicas e fisiológicas do organismo e com os processos ecológicos (Sarkar *et al.*, 1997; Holsbeek *et al.*, 1999; Solé *et al.*, 2001; Van der Oost *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2006). Assim, torna-se necessário quantificar e qualificar os potenciais efeitos que podem advir da exposição destes mesmos organismos aos contaminantes a que são sujeitos. Os efeitos podem surgir ao nível do metabolismo, do crescimento, da resistência a doenças, do potencial reprodutivo, do estado de saúde e da sobrevivência, podendo colocar em risco a existência dos organismos (Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011). Em Toxicologia, é importante definir a capacidade de medir a exposição a um agente tóxico, a amplitude da resposta tóxica e também estimar a provável resposta; deste modo, o impacto de poluentes tóxicos e persistentes no ecossistema marinho pode ser avaliado em termos de respostas biológicas em organismos (Timbrell, 1998; Cajaraville *et al.*, 2000). Neste sentido, os biomarcadores bioquímicos surgem como ferramentas essenciais para avaliar os riscos e efeitos decorrentes da exposição a substâncias químicas potencialmente tóxicas (Timbrell, 1998). Recentemente têm sido incorporados em programas de monitorização ambiental e são utilizados como sinais de alerta precoce de perturbações ambientais (Cajaraville *et al.*, 2000; Lam e Gray, 2003; Tsangaris *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2011).

Os biomarcadores são geralmente definidos como medidas funcionais de exposição e efeitos a factores de *stress* que podem surgir ao nível molecular, celular, fisiológico ou comportamental de um organismo individual (Hagger *et al.*, 2009). Estes devem ser quantitativos, sensíveis, não invasivos, específicos, facilmente mensuráveis, relacionados com o mecanismo bioquímico e trabalhados em doses realistas (Timbrell, 1998). Contudo, a utilização de biomarcadores, para uma melhor avaliação, requer conhecimentos sobre as substâncias tóxicas propriamente ditas, as enzimas nas espécies estudadas e os factores intrínsecos/extrínsecos (Domingues *et al.*, 2010). Os factores podem ser intrínsecos, sendo disso exemplo o tipo de tecido analisado, a idade/estágio de desenvolvimento ou a dieta, ou extrínsecos, como os factores ambientais, nomeadamente temperatura da água, concentração de oxigénio e pH (Domingues *et al.*, 2010). O contexto espaço-temporal, como a localização geográfica e a estação do ano, é igualmente um factor a ter em consideração pois pode influenciar a actividade enzimática (Domingues *et al.*, 2010).

É não só importante, como útil, classificar os biomarcadores em três categorias, nomeadamente os de exposição, de efeito/resposta e os de susceptibilidade (Timbrell, 1998). Um marcador de exposição pode ser identificado como uma substância exógena no sistema, o produto de interacção entre compostos xenobióticos e componentes endógenos, ou outros eventos no sistema biológico relacionado com a exposição (Committee on Biological Markers, 1987). Os biomarcadores podem ainda ser divididos em marcadores de dose interna e marcadores de dose efectiva (Timbrell, 1998). Por outro lado, um marcador de efeito/resposta pode ser um indicador de um componente endógeno do sistema biológico, uma medida da capacidade funcional do sistema ou um estado alterado do sistema que é reconhecido como deficiência ou doença (Committee on Biological Markers, 1987). Estes podem ser amplamente divididos em invasivos e não-invasivos, indicativos de danos patológicos e detectores de alterações bioquímicas (Timbrell, 1998). Finalmente, um marcador de susceptibilidade é definido como um indicador da saúde do sistema, sendo especialmente sensível para a exposição a compostos xenobióticos (Committee on Biological Markers, 1987). No entanto, esta divisão dos biomarcadores em três categorias é contestada, e em alguns estudos questiona-se os limites impostos para cada classe de biomarcadores, dado que estes acabam por estar interligados (Castro, 2001). Timbrell (1998) reconhece que as categorias dos biomarcadores podem, por vezes, sobrepor-se, tornando-se desta forma simples ou complexos. Neste sentido, Van der Oost *et al.* (2003) refere o conjunto de biomarcadores numa óptica funcional ou fisiológica: ex. enzimas de biotransformação, parâmetros de *stress* oxidativo, produtos de biotransformação, proteínas reguladoras, parâmetros hematológicos, parâmetros imunológicos, parâmetros reprodutivos e endócrinos, parâmetros genotóxicos, parâmetros neuromusculares, parâmetros fisiológicos e por fim parâmetros histológicos e morfológicos.

Como descreve Newman (2001), as vantagens do uso de biomarcadores são numerosas, destacando o facto dos biomarcadores serem mensuráveis antes de se sentirem efeitos adversos a níveis mais elevados de complexidade. Mais, os métodos para a sua quantificação são simples, rápidos e de baixo custo, sendo que a medição garante a qualidade padrão e o uso de práticas de garantia. Em alguns casos, os marcadores bioquímicos e celulares podem ser específicos para um ou para uma classe de contaminantes. Igualmente importante é a possibilidade de estabelecer uma relação dose-resposta entre o agente tóxico e o biomarcador, que é passível de ser aplicado a um número abrangente de espécies. Newman (2001) considera contudo que é desejável estabelecer a ligação entre o biomarcador e a diminuição da capacidade de sobrevivência.

Encontram-se documentados diversos estudos de monitorização envolvendo biomarcadores em peixes. Castro (2001) refere uma vasta bibliografia à data da sua revisão; estudos mais recentes surgiram entretanto, como por exemplo Martínez-Gómez *et al.* (2006), Hanson (2008), Martínez-Gómez *et al.* (2009), Sanchez e Porcher (2009), Solé *et al.* (2010) e Nunes (2011). Assim, os

biomarcadores em peixes podem ser ferramentas úteis em diversas etapas do processo de avaliação de risco, nomeadamente no efeito da exposição e avaliação do perigo, caracterização do risco, ou classificação e monitorização da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos (Van der Oost *et al.*, 2003). Os efeitos biológicos da poluição podem ser medidos em diferentes níveis de organização biológica, o que revela uma vantagem para a avaliação da qualidade ambiental, dado que a poluição implica riscos para os recursos vivos (Tsangaris *et al.*, 2010).

1.3. Actividade de enzimas como biomarcadores

Os biomarcadores são amplamente utilizados em estudos de campo, em programas de biomonitorização, para avaliar a resposta dos organismos aos contaminantes presentes no ambiente (Durieux *et al.*, 2011). Muitos contaminantes químicos que chegam aos sistemas aquáticos têm como tecido alvo o sistema nervoso central, causando neurotoxicidade. A monitorização da inibição das colinesterases em peixes tem sido amplamente utilizada em ecossistemas aquáticos como um indicador de exposição a poluentes neurotóxicos e consequentes efeitos fisiológicos (Nunes, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011). O resultado desta acção é visível através do surgimento de lesões neurotóxicas que podem resultar em mudanças comportamentais, comprometendo a sobrevivência ou a reprodução dos organismos expostos (Beauvais *et al.*, 2001). De entre os numerosos marcadores disponíveis, a avaliação da inibição da acetilcolinesterase (AChE) é dos mais frequentemente usados, e é interpretada como um biomarcador de neurotoxicidade. A AChE catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina, após a libertação na fenda sináptica de sinapses nervosas colinérgicas (Nunes *et al.*, 2005). Neste contexto, a acetilcolinesterase é fundamental na terminação do impulso nervoso. Assim, a regulação da sua síntese depende, através de um mecanismo de *feedback*, da activação das células nervosas através da propagação de um potencial de acção (Nunes, 2011). A inibição da acetilcolinesterase leva a uma acumulação do neurotransmissor acetilcolina na sinapse, provocando uma hiperestimulação dos receptores colinérgicos (Nunes *et al.*, 2005). Como resultado, ocorre disrupção da função do sistema nervoso (Galloway e Handy, 2003) e uma série de efeitos deletérios que podem culminar em insuficiência respiratória e morte (García-de la Parra *et al.*, 2006).

Acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) são tipos de colinesterases. As colinesterases (ChEs) são um grupo de enzimas pertencentes à família das esterases que hidrolisam ésteres carboxílicos (Domingues *et al.*, 2010). As ChEs possuem funções como regulação do crescimento da neurite (as projecções do corpo celular do neurónio) e proliferação celular, para além de se encontrarem envolvidas em doenças neurodegenerativas

(Nunes, 2011). Neste trabalho apenas é referida a AChE pois é a forma primordialmente expressa no cérebro e olhos de vários organismos (Nunes *et al.*, 2005).

Os insecticidas organofosforados (OPs), bem como os seus congéneres carbamatos, actualmente bastante utilizados para fins domésticos e agrícolas, têm como modo de acção a inibição selectiva da actividade de AChE (Durieux *et al.*, 2011). Além destes dois grupos de compostos, vários estudos têm mostrado a inibição da AChE por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais pesados e herbicidas (Bocquené *et al.*, 1995; Lionetto *et al.*, 2003; Roex *et al.*, 2003; Durieux *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011).

Stress fisiológico e bioquímico causado por hipoxia tem sido documentado numa vasta gama de organismos marinhos (Fischer *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1992). A lactato desidrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27) é uma importante enzima glicolítica em sistemas biológicos, e que é induzida pelo *stress* de oxigénio, ou seja, induzida por níveis baixos de oxigénio dissolvido (Wu e Lam, 1997) em organismos aquáticos. A LDH representa assim, uma ferramenta útil para a avaliação do estado respiratório dos organismos (Antunes *et al.*, 2009). É responsável por catalisar a conversão de piruvato a lactato (vulgo respiração anaeróbia), um passo essencial na produção de energia celular, com a conversão simultânea de NADH em NAD⁺ (Vassault, 1983). A LDH encontra-se envolvida na produção de energia, sendo particularmente importante quando é necessária energia adicional (Diamantino *et al.*, 2001; Nathan *et al.*, 2006). É mencionado por alguns autores que certos organismos marinhos apresentam uma correlação negativa entre a actividade da LDH e os níveis de oxigénio dissolvido, sugerindo uma possível adaptação bioquímica em resposta à menor disponibilidade de oxigénio (Diamantino *et al.*, 2001; Nathan *et al.*, 2006). A mesma tendência acontece também em situações de *stress* químico (Diamantino *et al.*, 2001; Nathan *et al.*, 2006).

O uso de enzimas de biotransformação envolvidas na destoxificação celular e excreção de poluentes como biomarcadores de exposição a xenobióticos tem sido objecto de grande interesse (Pennec e Penneec, 2003). O processo de biotransformação está estruturado, globalmente, em duas etapas interdependentes e contínuas denominadas de reacções de fase I e fase II (Huggett *et al.*, 1992). As reacções de fase I envolvem hidrólise, redução e oxidação dos xenobióticos (Klaassen, 2001). Assim, expõem ou introduzem um grupo funcional, que normalmente resulta num pequeno aumento na hidrofiliidade (Van der Oost *et al.*, 2003). De salientar que os grupos funcionais expostos ou introduzidos durante a fase I de biotransformação são muitas vezes locais de biotransformação de fase II. As reacções de biotransformação de fase II incluem glucuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutationa e conjugação com aminoácidos (Klaassen, 2001). A maioria das reacções de fase II resulta num grande aumento na hidrofiliidade/hidrossolubilidade dos xenobióticos que, conseqüentemente, promove a sua excreção (Klaassen, 2001).

Neste âmbito (enzimas da fase II) estão inseridas as glutathiona-S-transferases (GSTs). As GSTs (EC 2.5.1.18) constituem a família mais abundante da superfamília das transferases, e são amplamente encontradas na maioria dos eucariontes aeróbios e procariontes (Sheehan *et al.*, 2001). Esta enzima catalisa a conjugação de compostos electrofílicos gerados intracelularmente, ou encontrados na forma de xenobióticos (ou metabolitos de fase I), com a glutathiona reduzida (GSH) (Van der Oost *et al.*, 2003). Os produtos de conjugação da glutathiona são posteriormente processados, formando conjugados menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a sua excreção (Hyne e Maher, 2003; Domingues *et al.*, 2010). As GSTs são as enzimas mais importantes da fase II de biotransformação de xenobióticos orgânicos (por exemplo, PCBs, pesticidas clorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)) (Cheung *et al.*, 2002; Tsangaris *et al.*, 2010). Em resposta aos xenobióticos, a actividade enzimática pode ser induzida ao nível do DNA (Domingues *et al.*, 2010), como se encontra relatado em vários estudos de campo em peixes expostos a poluentes orgânicos (Martínez-Gómez *et al.*, 2006; Bozcaarmutlu *et al.*, 2009) e em invertebrados marinhos expostos a poluentes como o cobre (Cu) e cádmio (Cd) (Won *et al.*, 2011). De salientar que as GSTs podem desempenhar um duplo papel de protecção; ou seja, podem conjugar compostos electrofílicos (ou metabolitos de fase I) com a GSH, mas também podem utilizar a GSH na redução de hidroperóxidos orgânicos. Apesar desta actividade de peroxidase, não consegue reduzir H₂O₂ (Wang e Ballatori, 1998). Assim, as GSTs são muitas vezes referidas como ‘falsas peroxidases’.

Os contaminantes ambientais têm demonstrado exercer efeitos tóxicos relacionados com o *stress* oxidativo (Van der Oost *et al.*, 2003). A toxicidade de oxigénio é definida como prejudicial devido aos efeitos tóxicos de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Huggett *et al.*, 1992). Os produtos de redução de oxigénio molecular podem reagir com macromoléculas celulares críticas e levar à inactivação enzimática, peroxidação lipídica (LPO), danos no DNA e mesmo à morte celular (Van der Oost *et al.*, 2003). Assim, as actividades das enzimas antioxidantes, que defendem os organismos contra ROS, são extremamente importantes na destoxificação de radicais de moléculas não-reativas (Huggett *et al.*, 1992). A catalase (CAT) pertence ao sistema antioxidante celular que neutraliza a toxicidade de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e assim controla o *stress* oxidativo (Lionetto *et al.*, 2003). A catalase é uma enzima que contém um grupo heme, e que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigénio (O₂) (Chi *et al.*, 2010). A formação de peróxido de hidrogénio é uma característica comum em cenários de *stress* oxidativo, devido à actividade de degradação de uma enzima a montante na cascata de defesa oxidativa, a superóxido dismutase (SOD). Ou seja, em enzimas antioxidantes a SOD é sempre considerada como a primeira linha de defesa contra a toxicidade de oxigénio devido ao efeito inibitório na formação oxyradicais (Li *et al.*, 2010). A SOD é responsável por degradar o radical

superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produzindo peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Huggett *et al.*, 1992). A CAT assume uma função de protecção relacionada com a decomposição do peróxido de hidrogénio para evitar a acumulação de peróxidos tóxicos nas células (Montavon *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2010).

Estudos em peixes que habitam ambientes poluídos referem lesões idiopáticas e neoplasias, o que pode estar relacionado com um aumento de *stress* oxidativo, associado à exposição a poluentes (Van der Oost *et al.*, 2003). Estudos em campo e em laboratório, também em peixes, têm demonstrado actividades elevadas da enzima CAT devido à exposição crónica a poluentes orgânicos e consequente formação de ROS (Bozcaarmutlu *et al.*, 2009).

1.4. Variabilidade natural de parâmetros bioquímicos e fisiológicos

É possível avaliar os efeitos que decorrem de factores de *stress* ambiental através do uso de biomarcadores, no entanto, é necessário alguma precaução no seu uso. Os mesmos atributos que tornam a abordagem de utilizar um biomarcador uma ferramenta poderosa para monitorização biológica, também alertam contra a aplicação rápida e indiscriminada (Huggett *et al.*, 1992). Existem muitas variáveis, não relacionadas com a poluição, que podem ter um impacto adicional sobre os sistemas enzimáticos e interferir com a resposta de biomarcadores, quando as condições experimentais não são cuidadosamente analisadas (Huggett *et al.*, 1992). Entre muitas das variáveis que podem interferir com as respostas, salienta-se a saúde dos organismos, sexo, idade, estado nutricional, actividade metabólica, comportamento migratório, estado reprodutivo, densidade populacional, assim como factores ambientais, como a estação do ano e temperatura (Van der Oost *et al.*, 2003). Assim, a variabilidade natural influencia a capacidade de detectar os efeitos da contaminação. Torna-se então útil acompanhar as alterações nas medidas toxicológicas (biomarcadores) com medidas que permitam avaliar o estado reprodutivo, alimentar, e fisiológico dos organismos, neste caso nos peixes.

O índice gonadosomático (GSI) e o índice hepatossomático (HSI), ou seja, o peso relativo das gónadas ou do fígado comparativamente com o peso corporal, são dois índices fisiológicos bastante estudados em peixes (Fang *et al.*, 2009). Somarakis *et al.* (2004) consideram mais adequado o cálculo dos índices somáticos baseados no peso eviscerado de peixes, uma vez que não incluem o peso das gónadas ou do fígado, e não são influenciados pela quantidade de alimento nos estômagos dos peixes. A relação peso-comprimento é também utilizada para medir a condição dos peixes, no que se denomina por factor de condição (K) (Van der Oost *et al.*, 2003).

O GSI pode ter ligações com as funções reprodutivas, pelo que varia entre machos e fêmeas e é sensível ao ciclo de desova dos peixes, ao desenvolvimento do ovário, à variação

sazonal, ao estado nutricional, e à temperatura da água (Yang, 2004; Fang *et al.*, 2009). Os ciclos de reprodução dos peixes estão em sintonia com mudanças no tamanho das gónadas, portanto, para uma determinada fase de desenvolvimento o tamanho das gónadas aumenta (proporcional ou desproporcionalmente) com o aumento do tamanho do peixe (Somarakis *et al.*, 2004). A exposição a poluentes pode resultar em alterações das gónadas, assim como uma diminuição do GSI e alterações morfológicas (Choudhury *et al.*, 1993; Friedmann *et al.*, 1996). A redução do GSI foi documentada em peixes expostos a metais pesados e PCBs, demonstrando alterações reprodutivas (Sol *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2009).

O HSI pode fornecer uma indicação do estado nutricional dos peixes, uma vez que o fígado funciona como um importante local de armazenamento para o glicogénio (Sol *et al.*, 2008). Encontram-se documentadas várias alterações no fígado, como necroses e neoplasias, possivelmente devido à exposição a agentes tóxicos (Yang, 2004). As alterações levam a um aumento dos fígados por hiperplasia (aumento no número de células) ou hipertrofia (aumento no tamanho das células), que se reflecte no HSI (Yang, 2004). Foram detectados valores elevados de HSI em peixes que se encontravam em águas poluídas com elevados níveis de PAHs, PCBs e efluentes de águas residuais (Fang *et al.*, 2009). É necessária precaução com outros factores que podem causar variação nos valores de HSI, nomeadamente a infecção por parasitas (Yang, 2004).

O factor de condição (K) reflecte o balanço de energia dos peixes, o investimento de energia na reprodução e as condições físicas adversas (Ballón *et al.*, 2008). Este índice pode ser afectado pela disponibilidade de alimento, a competição de espécies, a temperatura ambiente, bem como a exposição a xenobióticos (Yang, 2004).

1.5. *Sardina pilchardus*

Os pequenos peixes pelágicos são elementos essenciais nos ecossistemas marinhos, desempenhando um importante papel na ligação aos outros níveis tróficos devido à sua significativa biomassa nos níveis intermediários da cadeia alimentar (Cury *et al.*, 2000). Apesar de possuírem limitações, como a mobilidade relativamente elevada (e conseqüente impossibilidade de servirem como bioindicadores, pois não estão limitados a uma área geográfica circunscrita), são considerados os organismos mais viáveis para a monitorização da poluição nos ecossistemas aquáticos (Van der Oost *et al.*, 2003; Peixoto *et al.*, 2006; Stanic *et al.*, 2006).

A sardinha europeia (*Sardina pilchardus*) é o alvo tradicional da importante pesca pelágica na costa atlântica da Península Ibérica (Chícharo, 1998). A pesca da sardinha é realizada através da pesca de cerco, onde a colocação rápida de uma longa rede (até 800 m de comprimento e 150 m de

profundidade) envolve os peixes pelágicos, identificados pelo equipamento electrónico, formando uma bolsa que posteriormente é transportada para bordo (Marçalo *et al.*, 2006). *Sardina pilchardus* é uma espécie de peixe que exhibe uma importância comercial crescente e um aumento da procura por parte do consumidor. De acordo com dados de 2010 da DGPA (Direcção Geral das Pescas e Aquicultura), foram capturadas cerca de 63.000 toneladas de sardinha em toda a costa Portuguesa, e as embarcações facturaram cerca de 403 milhões de euros na venda desta espécie ¹.

Sardina pilchardus é um pequeno peixe pelágico costeiro que possui movimento diário vertical, ou seja, durante o dia situa-se entre 25-55 m e à noite entre 15-35 m de profundidade (Whitehead *et al.*, 1989). É caracterizada pelo rápido crescimento e ciclo de vida relativamente curto, podendo no entanto atingir 9 anos de idade (Sinovčić *et al.*, 2008).

Esta espécie localiza-se numa vasta área de distribuição, que se estende desde o sul de Marrocos/Mauritânia até ao Canal da Mancha/Mar da Irlanda, e desde os Açores até ao Mediterrâneo Oriental/Mar Negro (Stratoudakis e Silva, 2001). Com base em estudos morfológicos e variações fenotípicas, diferenciaram-se duas subespécies de *Sardina pilchardus*: *S. p. pilchardus* (possível de se localizar a leste do Oceano Atlântico e do Mar do Norte ao Sul de Portugal) e *S. p. sardina* (possível de se localizar no Mar Mediterrâneo e na costa do noroeste Africano) (Gonzalez e Zardoya, 2007).

Relativamente à alimentação, *Sardina pilchardus* é omnívora, essencialmente filtradora, com uma dieta constituída principalmente por organismos mesozoplânctónicos (por exemplo, copépodes, cladóceros, larvas de crustáceos e ovos), que são assimilados de forma mais eficiente do que o fitoplâncton (Costa e Garrido, 2004; Palomera *et al.* 2007). A sardinha revela uma elevada variabilidade sazonal e geográfica no conteúdo de ácidos gordos e na composição da dieta, acumulando as reservas de gordura nas vísceras, músculos e sob a pele (Garrido *et al.*, 2007). Como referido por Garrido *et al.* (2007), as sardinhas que vivem em zonas de *upwelling* (fenómeno de ressurgência de águas profundas mais frias e ricas em nutrientes) ao largo da costa oeste de Portugal têm maiores concentrações de ácidos gordos no músculo do que as sardinhas que vivem ao largo da costa sul de Portugal, o que sugere uma maior contribuição do fitoplâncton na dieta dos peixes, quando comparando os valores das sardinhas capturadas no oeste com os valores das sardinhas do sul.

A espécie em análise possui sexos separados e reproduz-se a primeira vez geralmente no final do primeiro ano de vida, com 15-16 cm de comprimento (Stratoudakis e Silva, 2001). Efectua desova em massa, com gametogénese contínua, fecundação externa e sem cuidado parental (Sinovčić *et al.*, 2008). Cada fêmea gera entre 50 000 a 60 000 ovos, com um diâmetro de 1,5 mm

¹ DATAPESCAS N° 87 / Janeiro a Dezembro 2010. http://www.dgpa.min-agricultura.pt/xportal/xmain?xpid=dgpa&xpgid=detPublicacao&detPublicacao_qry=boui=196143, acedido a 23 de Maio de 2011

(ICES, 2008). O pico máximo de desova ocorre a temperaturas entre 14°C e 16°C (Chícharo, 1998). Esta espécie tem duas épocas de desova na nossa costa: uma no Inverno (no mês de Dezembro) e outra na estação da Primavera (entre os meses de Abril e Maio) (Chícharo, 1998). As áreas de postura estão sempre localizadas ao longo da plataforma continental, principalmente até uma distância da linha de costa de 10 a 15 milhas náuticas (Ré, 1984). Existe uma maior proporção de fêmeas, o que se traduz numa vantagem para as populações com relação sexual dirigida para as fêmeas, que se reflecte numa maior taxa de reprodução (Ré, 1984; Sinovčić *et al.*, 2008). O ciclo de reprodução e a distribuição sazonal dos Clupeidae (família a que pertencem as sardinhas), e dos peixes em geral, parece estar relacionado com o ciclo anual de produção fito e zooplancónica (Ré, 1984). Neste sentido, nas regiões onde se verifique *upwelling*, a época de postura pode ser mais prolongada (Ré, 1984). Outro factor que pode igualmente condicionar a reprodução é a temperatura, pois esta interfere no controlo da postura (Sousa, 2008). O factor salinidade não parece exercer influência, desde que a temperatura da água seja adequada (Sousa, 2008).

Sardina pilchardus é migradora, sendo as principais razões para a migração a hidrografia (temperatura, salinidade e teor de oxigénio) e os factores bióticos (alimentação e reprodução) (Sinovčić *et al.*, 2008). Segundo dados apresentados por Ré (1984), as dimensões dos indivíduos adultos, por classe de idade, aumentam de um modo gradual da região sul em direcção à região norte da costa portuguesa, sugerindo assim que existirá uma migração de *Sardina pilchardus* no sentido sul-norte.

Objectivos da dissertação

O presente trabalho pretendeu monitorizar mensalmente alterações fisiológicas/adaptativas de *Sardina pilchardus* capturados ao largo da costa Portuguesa, e descarregadas em três portos comerciais nacionais (Matosinhos, Aveiro e Peniche), durante um período de nove meses (Maio'10 – Janeiro'11). Para tal, utilizou-se uma abordagem de quantificação de uma bateria de biomarcadores, que incluiu a acetilcolinesterase (AChE), a catalase –(CAT), as glutationa-S-transferases –(GSTs), e a lactato desidrogenase –(LDH), e ainda a quantificação de várias métricas indicativas do estado nutricional, fisiológico, e reprodutivo (índices de condição – K, K (gut), K (liver); índice hepatossomático – HSI; e índice gonadossomático – GSI). Estas enzimas foram seleccionadas como presumíveis biomarcadores de efeito ao nível de disrupção da neurotransmissão, de proliferação peroxissomal/*stress* oxidativo, de destoxificação/*stress* oxidativo e de alteração do metabolismo anaeróbio, respectivamente. Assim, o objectivo do presente trabalho foi o de perceber se o uso de biomarcadores, enquanto ferramenta de avaliação da exposição a

contaminantes, é de algum modo afectado pela variabilidade natural (população/zona geográfica e ciclo de vida/sazonalidade). Pretende-se que o presente trabalho responda a algumas questões como: as sardinhas são afectadas pela contaminação antropogénica?; que marcadores podemos utilizar para avaliar a potencial resposta a contaminantes?; os perfis enzimáticos (biomarcadores) são diferentes entre locais?; e, por último, os padrões de resposta da espécie variam com o momento da captura (i.e. sazonalidade)?

Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1. Locais de amostragem

Os locais de amostragem foram distribuídos geograficamente de norte para sul no território continental, nomeadamente Porto de Leixões, Porto de Aveiro e Porto de Peniche (figura 1). O Porto de Leixões situa-se à longitude $8^{\circ} 42' 14,112''$ W e latitude $41^{\circ} 11' 14,0814''$ N, a norte da foz do Rio Douro, no concelho de Matosinhos, sendo uma das mais importantes infra-estruturas portuárias do País. O Porto de Aveiro situa-se à longitude $8^{\circ} 43' 54,588''$ W e latitude $40^{\circ} 38' 46,3668''$ N, a 35 milhas marítimas a sul do Porto de Leixões, no concelho de Aveiro. O Porto de Peniche situa-se à longitude $9^{\circ} 22' 8,9394''$ W e latitude $39^{\circ} 21' 21,189''$ N. Encontra-se a 63 milhas a sul do Porto de Aveiro e é um porto essencialmente piscatório e de construção recente.

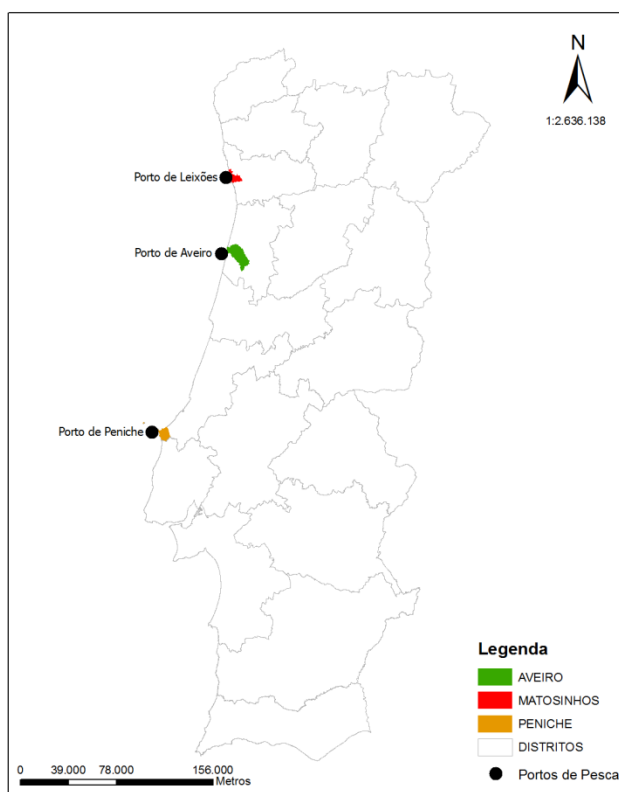


Figura 1: Mapa de Portugal Continental com a localização dos três portos de pesca do estudo

2.2. Estratégia de amostragem e processamento do material biológico

As sardinhas (*Sardina pilchardus*) foram obtidas com periodicidade mensal, de Maio de 2010 a Janeiro de 2011, nos portos de Peniche, Aveiro e Matosinhos (Figura 1). Os organismos foram gentilmente cedidos pela entidade que gere o pescado (DOCAPESCA Portos e Lotas, S.A.) nos referidos portos, no dia em que foram capturados e descarregados. Foi amostrado um total de 270 sardinhas, tendo sido analisadas 10 sardinhas por mês e por porto. Esta estratégia de amostragem, que se baseou na captura de amostras por intermédio de embarcações de pesca artesanal, limita o raio geográfico da amostragem, devido à relativa pequena autonomia das embarcações. Deste modo, é possível assumir a amostragem de três populações putativamente distintas de sardinha. Por outro lado, a refrigeração do pescado, que é mandatória para a sua conservação, permitiu obter amostras de boa qualidade, sem alterações bioquímicas significativas.

No laboratório, cada sardinha foi medida (comprimento total), e posteriormente eviscerada e pesada. Seguidamente, retiraram-se e pesaram-se as gónadas, o intestino e o fígado. Estas medições e pesagens serviram para avaliar o estado alimentar, reprodutivo e fisiológico dos organismos, através do cálculo de métricas largamente disseminadas (Fang *et al.*, 2009) – ver ponto 2.4. Adoptou-se a metodologia de pesar o peixe após evisceramento, pois a quantidade de alimento no estômago, o peso das gónadas e/ou do fígado podia influenciar os índices calculados. Por fim, foram extraídos selectivamente alguns órgãos, nomeadamente o fígado, as brânquias, o músculo, o cérebro e olhos para quantificar os biomarcadores. Efectuou-se a determinação das glutathione-S-transferases (GST) e catalase (CAT) no fígado, glutathione-S-transferases (GSTs) nas brânquias, lactato desidrogenase (LDH) no músculo, e acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e olhos (ver ponto 2.3).

Como refere Nunes *et al.* (2008), a utilização do fígado na avaliação de biomarcadores de destoxificação (*stress* oxidativo ou outro) justifica-se pelo seu papel primordial na destoxificação nos vertebrados. Também as brânquias desempenham um papel vital como principal barreira contra a entrada de xenobióticos no organismo e, provavelmente, também como uma primeira linha de destoxificação e eliminação de agentes nocivos (Nunes *et al.*, 2008). O músculo branco é ideal para quantificar a LDH, pois é um tecido abundante em mitocôndrias, organelos responsáveis pela respiração (Li *et al.*, 2011). Segundo Nunes (2011), o cérebro desempenha papéis importantes nas funções motoras e sensitivas, sendo ideal para quantificar AChE, a qual participa no processo de neurotransmissão.

2.3. Análise enzimática

Todas as actividades enzimáticas foram determinadas de acordo com a lei de Beer-Lambert, $A = \epsilon l c$, onde A é a absorvância, ϵ o coeficiente de absorvidade molar, l o percurso óptico e c a concentração da amostra em solução. Esta lei foi adaptada de forma a ter em conta o factor de diluição da amostra associado aos reagentes respectivos de cada ensaio enzimático e da respectiva amostra. A actividade da amostra foi normalizada tendo em conta a quantidade da proteína presente na amostra.

2.3.1. Acetilcolinesterase (AChE)

As amostras (cabeça: cérebro + olhos) foram homogeneizadas a frio em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) em homogeneizador rotativo e, de seguida, centrifugadas a 4°C durante 3 min a 6000 rpm. O resíduo resultante foi desprezado e o sobrenadante armazenado e congelado (- 20°C) para posterior análise. A actividade da AChE, no cérebro e olhos, foi determinada espectrofotometricamente num leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX, através do método de Ellman *et al.* (1961), adaptado para microplaca (ver Guilhermino *et al.*, 1996). O ensaio consistiu na medição do aumento da absorvância das amostras a 405 nm, na presença de acetiltiocolina (substrato) e DTNB (ditiobisnitrobenzoato). A AChE degrada o substrato em acetato e tiocolina, sendo que esta última complexa com o DTNB, originando um composto amarelo ($\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A actividade da AChE foi expressa em μmoles de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína.

2.3.2. Catalase (CAT)

As amostras (fígado) foram homogeneizadas a frio em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0 com 0,1% Triton X-100) e, de seguida centrifugadas a 4°C durante 10 min a 14000 rpm. O resíduo resultante foi desprezado e o sobrenadante dividido em alíquotas e congelado (- 20°C) para posterior análise. As amostras de fígado foram utilizadas para determinar simultaneamente a actividade da catalase e das glutathiona-S-transferases. A actividade da catalase, no fígado, foi determinada no UV/Vis. Spectrophotometer, através da decomposição de H_2O_2 para água e oxigénio, que pode ser seguido através da diminuição da absorvância a 240 nm, como descrito por Aebi (1984). O ensaio da catalase baseia-se assim, na diminuição da absorvância da amostra

monitorizada espectrofotometricamente a 240 nm ($\epsilon_{240} = 0,00394 \pm 0,0002 \text{ L mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$) durante 30 segundos. As actividades foram expressas em μmol de H_2O_2 consumido por minuto por mg de proteína.

2.3.3. Glutathiona-S-transferase (GSTs)

As amostras previamente obtidas (ver ponto 2.3.2) foram utilizadas para a determinação da actividade das GSTs, por medição espectrofotométrica num leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX, adaptado de Habig *et al.* (1974). O ensaio consiste na conjugação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH (glutathiona), formando um tioéter ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que pode ser monitorizado pelo aumento de absorvância a 340 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de tioéter produzido por minuto por mg de proteína.

2.3.4. Lactato desidrogenase (LDH)

As amostras de tecido muscular (músculo dorsal) foram homogeneizadas a frio em tampão Tris/NaCl (pH 7,2), e de seguida, foram realizados três ciclos consecutivos de congelamento/descongelamento a -20°C e a temperatura ambiente. Tal passo foi requerido visto ser necessário forçar a ruptura da membrana da célula muscular, de forma a externalizar o conteúdo enzimático, para posterior quantificação. Numa etapa posterior, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 3 min a 6000 rpm. O resíduo resultante foi desprezado e o sobrenadante armazenado e congelado (-20°C) para posterior análise. A actividade da LDH foi determinada espectrofotometricamente num leitor de microplacas Labsystem Multiskan EX, através do método de Vassault (1983), adaptado para microplaca (ver Diamantino *et al.* 2001). O ensaio consiste na diminuição da absorvância da amostra a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) devido à oxidação de NADH e concomitante redução do piruvato (substrato). A actividade da LDH foi expressa em μmol de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína.

2.3.5. Proteína total

Após realizar a determinação enzimática, procedeu-se a determinação da proteína solúvel total das amostras, a fim de expressar a actividade enzimática em função da quantidade de proteína

das amostras analisadas. A concentração de proteína nas amostras foi determinada a 595 nm de acordo com Bradford (1976), adaptado a microplaca.

2.4. Estado nutricional, fisiológico e reprodutivo

Com base no peso do peixe eviscerado, peso do fígado, peso das gónadas, peso do intestino e comprimento total (ver ponto 2.2), calcularam-se diversos índices somáticos. O índice gonadossomático (GSI), o índice hepatossomático (HSI), o factor de condição (K) e suas derivações específicas para intestino (K (gut)) e fígado (K (liver)), foram determinados de acordo com as seguintes equações:

$$\text{GSI (\%)} = (\text{peso das gónadas} / \text{peso eviscerado}) \times 100$$

$$\text{HSI (\%)} = (\text{peso total do fígado} / \text{peso eviscerado}) \times 100$$

$$\text{K} = (\text{peso eviscerado} / \text{comprimento total}^3) \times 1000$$

$$\text{K (gut)} = (\text{peso intestino} / \text{comprimento total}^3) \times 1000$$

$$\text{K (liver)} = (\text{peso fígado} / \text{comprimento total}^3) \times 1000$$

2.5. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o software R (R 2.13.0) e o GUI (*graphical user interface*) R commander ^{2,3}. Os vários parâmetros enzimáticos e os índices relativos ao estado alimentar, fisiológico, e reprodutivo, foram analisados com análise de variância (ANOVA) bifactorial (para averiguar a existência de diferenças entre populações, mês de colheita, e interação entre os dois factores) e unifactorial (para explorar o padrão sazonal de cada população). Foram também efectuadas análises de correlação para determinar associações significativas entre os biomarcadores enzimáticos e o estado alimentar, fisiológico, e reprodutivo dos organismos.

² R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, acedido a 3 de Junho de 2011

³ Fox J, with contributions from Andronic L, Ash M, Boye T, Calza S, Chang A, Grosjean P, Heiberger R, Kerns GJ, Lancelot R, Lesnoff M, Ligges U, Messad S, Maechler M, Muenchen R, Murdoch D, Neuwirth E, Putler D, Ripley B, Ristic M, Wolf P (2011). Rcmdr: R Commander. R package version 1.6-4. <http://CRAN.R-project.org/package=Rcmdr>, acedido a 3 de Junho de 2011

Resultados

3. Resultados

3.1. Biomarcadores

Os dados dos biomarcadores analisados em *Sardina pilchardus* descarregada em 3 portos portugueses (Aveiro, Peniche e Matosinhos), durante nove meses de amostragem, apresentaram uma elevada variabilidade (figura 2).

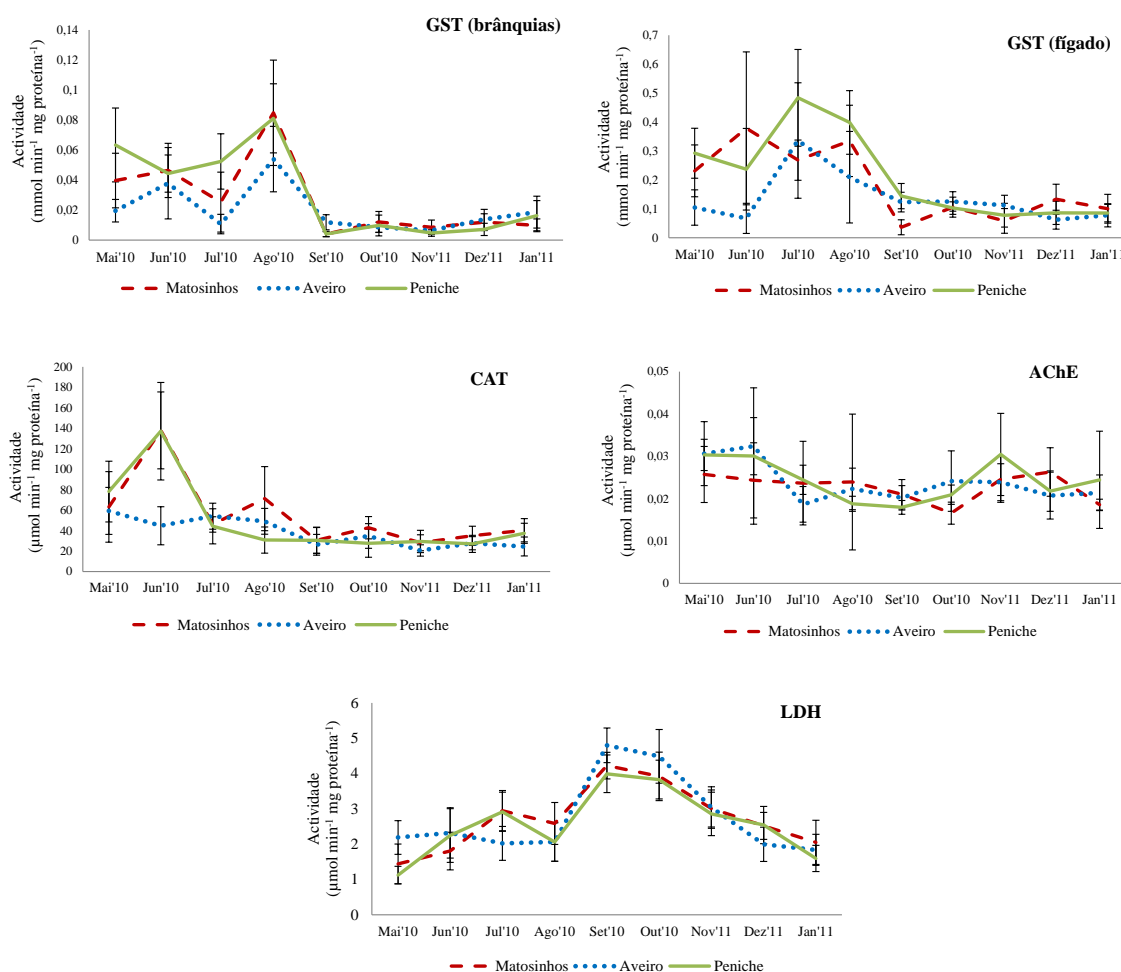


Figura 2: Variação de vários parâmetros enzimáticos (GST (brânquias), GST (fígado), CAT, AChE e LDH) em sardinha (*Sardina pilchardus*) descarregada em 3 portos portugueses (Aveiro, Peniche e Matosinhos), ao longo de 9 meses (Maio 2010 a Janeiro 2011). Os valores correspondem à média das medições efectuadas por local e por mês, e as barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

O maior contributo para a variabilidade global dos dados foi a variabilidade entre os meses (ver a partição da variância entre os factores), ou seja, a sazonalidade (tabela 1). A variabilidade entre locais (Aveiro, Matosinhos e Peniche) contribuiu menos para a variabilidade total dos dados

(tabela 1). No entanto, em todos os casos verificou-se uma variação significativa na interacção entre local e o mês de amostragem, o que significa que o padrão sazonal não foi consistente entre locais (figura 2). Esse motivo justificou uma análise mais detalhada por local.

Tabela 1: Quadro-resumo da análise de variância (ANOVA) bifactorial para os vários parâmetros enzimáticos (GST (brânquias), GST (fígado), CAT, AChE e LDH). Para cada um dos factores, estão representados os graus de liberdade (g.l.), a variância, o valor do teste de F, e o valor de probabilidade (p) associado. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.

Biomarcador	Fonte de variação	g.l	Variância	F	p
GST (brânquias)	Local	2	0,0030	14,7	< 0,001
	Mês	8	0,0153	74,4	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	0,0012	6,1	< 0,001
	Residual	242	0,0002	-	-
GST (fígado)	Local	2	0,1319	15,1	< 0,001
	Mês	8	0,3169	36,3	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	0,0544	6,2	< 0,001
	Residual	229	0,0087	-	-
CAT	Local	2	4784,8	13,9	< 0,001
	Mês	8	18251,8	53,1	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	2438,0	7,1	< 0,001
	Residual	222	343,7	-	-
AChE	Local	2	0,00006	1,3	0,283
	Mês	8	0,00036	7,1	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	0,00010	2,0	0,015
	Residual	241	0,00005	-	-
LDH	Local	2	0,5771	1,9	0,149
	Mês	8	27,2641	90,7	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	1,4575	4,8	< 0,001
	Residual	231	0,3006	-	-

Relativamente à GST nas brânquias, verificou-se que a actividade nos três locais amostrados foi significativamente superior no período de Maio a Agosto (figura 2), contudo este padrão foi menos evidente em Aveiro (tabela 2). Entre os meses de Setembro e Janeiro, a actividade diminuiu consideravelmente, relativamente a Maio - Setembro, sendo que o padrão sazonal foi comparável nos três locais (figura 2). Em todos os locais, Agosto correspondeu ao pico máximo de actividade da GST (brânquias) (figura 2).

A actividade das GST no fígado foi significativamente superior no período de Maio a Agosto, para Matosinhos e Peniche (tabela 2). Para a população de Aveiro isto só se verificou em Julho. Em todos os locais, o mês de Julho correspondeu ao pico máximo de actividade (figura 2). À semelhança das GST nas brânquias, a actividade das GST no fígado diminuiu consideravelmente entre os meses de Setembro a Janeiro, em relação a Maio - Setembro, sendo que o padrão sazonal foi comparável nos três locais (figura 2).

A actividade da CAT foi significativamente superior no período entre Maio – Junho (tabela 2 e figura 2). Matosinhos e Peniche apresentaram o mesmo padrão de actividade, com um pico

bastante pronunciado em Junho e uma diminuição considerável nos restantes meses (figura 2). Em Aveiro não se verificou um pico tão pronunciado na actividade.

A actividade da AChE não seguiu um padrão consistente entre os locais amostrados ao longo dos meses, tendo sido muito irregular (figura 2). Em Matosinhos não se observaram quaisquer diferenças significativas entre meses, ao passo que em Aveiro a actividade foi significativamente superior em Maio e Junho, e em Peniche verificaram-se dois picos significativos em Maio e Novembro (tabela 2 e figura 2).

O padrão da LDH foi relativamente consistente entre todos os locais amostrados (figura 2). A actividade aumentou progressivamente a partir de Maio e atingiu um máximo estatisticamente significativo em Setembro e Outubro (atingindo em Setembro o pico máximo de actividade), tendo posteriormente decrescido de forma contínua até Janeiro (tabela 2 e figura 2).

Tabela 2: Quadro-resumo da análise de variância (ANOVA) unifactorial para os vários parâmetros enzimáticos (GST (brânquias), GST (fígado), CAT, AChE e LDH), por local de amostragem. Para cada uma das fontes de variação estão representados os graus de liberdade (g.l.), a variância, o valor do teste de F, e a probabilidade (p) associada. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.

Biomarcador	Local	Fonte de variância	g.l	Variância	F	p
GST (brânquias)	Matosinhos	Mês	8	0,0069	25,7	< 0,001
		Residual	81	0,0003	-	-
	Aveiro	Mês	8	0,0025	16,6	< 0,001
		Residual	81	0,0001	-	-
	Peniche	Mês	8	0,0085	41,9	< 0,001
		Residual	80	0,0002	-	-
GST (fígado)	Matosinhos	Mês	8	0,1486	13,2	< 0,001
		Residual	78	0,0112	-	-
	Aveiro	Mês	8	0,0627	8,8	< 0,001
		Residual	76	0,0071	-	-
	Peniche	Mês	8	0,2144	27,6	< 0,001
		Residual	75	0,0078	-	-
CAT	Matosinhos	Mês	8	9026,3	21,6	< 0,001
		Residual	74	418,5	-	-
	Aveiro	Mês	8	1919,66	11,8	< 0,001
		Residual	74	163,07	-	-
	Peniche	Mês	8	12181,7	27,1	< 0,001
		Residual	74	449,4	-	-
AChE	Matosinhos	Mês	8	1,1 e ⁻⁰⁴	1,8	0,096
		Residual	81	6,2 e ⁻⁰⁵	-	-
	Aveiro	Mês	8	2,1 e ⁻⁰⁴	7,2	< 0,001
		Residual	80	3,0 e ⁻⁰⁵	-	-
	Peniche	Mês	8	2,4 e ⁻⁰⁴	3,9	< 0,001
		Residual	80	6,1 e ⁻⁰⁵	-	-
LDH	Matosinhos	Mês	8	8,3134	27,7	< 0,001
		Residual	79	0,3002	-	-
	Aveiro	Mês	8	13,204	42,9	< 0,001
		Residual	75	0,308	-	-
	Peniche	Mês	8	8,6612	29,5	< 0,001
		Residual	77	0,2938	-	-

3.2. Métricas de estado nutricional, fisiológico, e reprodutivo

Os dados dos índices relativos ao estado alimentar, fisiológico e reprodutivo, analisados em *Sardina pilchardus* descarregada em 3 portos portugueses (Aveiro, Peniche e Matosinhos), durante nove meses de amostragem, apresentaram alguma variação natural (figura 3).

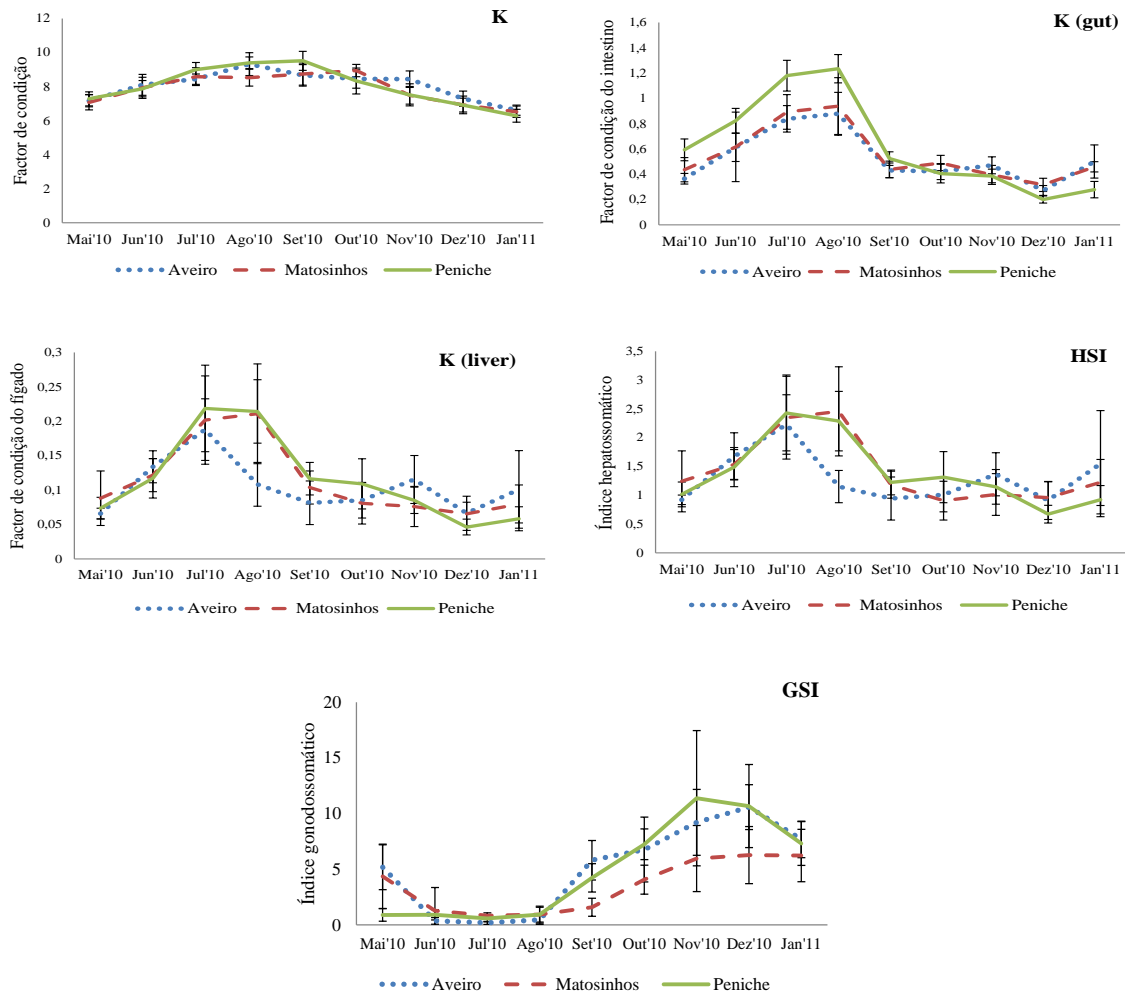


Figura 3: Variação de vários índices relativos ao estado alimentar, fisiológico, e reprodutivo (K, K (gut), K (liver), HSI e GSI) em sardinha (*Sardina pilchardus*) descarregada em 3 portos portugueses (Aveiro, Peniche e Matosinhos), ao longo de 9 meses (Maio 2010 a Janeiro 2011). Os valores correspondem à média das medições efectuadas por local e por mês, e as barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

O maior contributo para a variabilidade global dos dados foi atribuído à variação entre meses (ver a partição da variância entre os factores), ou seja, revelou um padrão sazonal (tabela 3). Uma menor contribuição para a variabilidade dos dados foi dada pelos locais (tabela 3). No entanto, em todos os casos verificou-se uma variação significativa na interacção entre local e mês

de amostragem, o que significa que o padrão sazonal nem sempre foi consistente entre locais, à semelhança do observado para os biomarcadores enzimáticos. Esse motivo justificou uma análise mais detalhada por local.

Tabela 3: Quadro-resumo da análise de variância (ANOVA) bifatorial para os índices relativos ao estado alimentar, fisiológico, e reprodutivo (GSI, HSI, K, K (gut) e K (liver)), por local de amostragem. Para cada uma das fontes de variação estão representados os graus de liberdade (gl), variância, o valor do teste de F, e a probabilidade (p) associada). As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.

Índices	Fonte de variância	g.l	Variância	F	p
K	Local	2	0,9619	3,8	0,024
	Mês	8	25,6418	100,7	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	1,1729	4,6	< 0,001
	Residual	243	0,2546	-	-
K (gut)	Local	2	0,2142	18,2	< 0,001
	Mês	8	2,0849	177,7	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	0,1266	10,8	< 0,001
	Residual	243	0,0117	-	-
K (liver)	Local	2	0,0029	2,2	0,107
	Mês	8	0,0703	54,2	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	0,0066	5,1	< 0,001
	Residual	243	0,0013	-	-
HSI	Local	8	7,1411	37,6	< 0,001
	Mês	2	0,3587	1,9	0,1534
	Interacção (local*mês)	16	0,9199	4,8	< 0,001
	Residual	243	0,1899	-	-
GSI	Local	2	70,54	14,9	< 0,001
	Mês	8	353,34	74,8	< 0,001
	Interacção (local*mês)	16	25,43	5,4	< 0,001
	Residual	243	4,72	-	-

O índice de condição (K) aumentou gradualmente a partir de Maio, tendo atingido o seu valor máximo – e significativamente superior aos restantes meses – em Agosto e Setembro para as populações de Aveiro e Peniche, e em Setembro e Outubro para Matosinhos (tabela 4 e figura 3). Nos três locais amostrados, o índice de condição decresceu de forma gradual após este pico e até ao Inverno (figura 3).

O índice K (gut) foi significativamente superior em Julho - Agosto, de forma consistente entre todos os locais (tabela 4). Nos três locais amostrados, o índice aumentou de Maio a Julho - Agosto, tendo a partir desse mês diminuído de forma acentuada (figura 3).

O índice K (liver) e o HSI (ambos indicadores da condição hepática) seguem o mesmo padrão (figura 3). Ambos os índices atingem um pico máximo em Julho - Agosto, embora isto não seja muito consistente entre os locais, sobretudo por causa da amostra de Aveiro (tabela 4 e figura 3). Aveiro atinge um pico máximo apenas no mês de Julho. Na globalidade de todos os locais, os índices aumentam a partir de Maio, atingem um pico máximo no Verão e diminuem.

O índice GSI seguiu um padrão absolutamente inverso ao do K (gut), K (liver), e HSI, tendo sido mínimo de Junho a Agosto (figura 3). A partir de Setembro, altura em que se verificou o decréscimo da condição alimentar e hepática, o GSI subiu consideravelmente até atingir o pico máximo em Novembro – Dezembro (tabela 4). Este padrão foi mais ou menos consistente entre locais, com excepção de Matosinhos que não apresentou uma subida tão intensa durante o Inverno.

Tabela 4: Quadro-resumo da análise de variância (ANOVA) unifactorial para os vários os índices relativos ao estado alimentar, fisiológico, e reprodutivo (GSI, HSI, K, K (gut) e K (liver)), por local de amostragem. Para cada uma das fontes de variação estão representados os graus de liberdade (g.l.), a variância, o valor do teste de F, e a probabilidade (p) associada. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas a negrito.

Índice	Local	Fonte de variância	g.l	Variância	F	p
K	Matosinhos	Mês	8	7,9101	30,947	< 0,001
		Residual	81	0,2556	-	-
	Aveiro	Mês	8	7,2921	29,0	< 0,001
		Residual	81	0,2514	-	-
	Peniche	Mês	8	12,7855	49,8	< 0,001
		Residual	81	0,2568	-	-
K (gut)	Matosinhos	Mês	8	0,4872	25,487	< 0,001
		Residual	81	0,0191	-	-
	Aveiro	Mês	8	0,4294	45,844	< 0,001
		Residual	81	0,0094	-	-
	Peniche	Mês	8	1,4216	211,4	< 0,001
		Residual	81	0,0067	-	-
K (liver)	Matosinhos	Mês	8	0,0300	18,11	< 0,001
		Residual	81	0,0016	-	-
	Aveiro	Mês	8	0,0147	12,9	< 0,001
		Residual	81	0,0011	-	-
	Peniche	Mês	8	0,0389	35,65	< 0,001
		Residual	81	0,0011	-	-
HSI	Matosinhos	Mês	8	3,4045	15,3	< 0,001
		Residual	81	0,2224	-	-
	Aveiro	Mês	8	1,9961	9,7	< 0,001
		Residual	81	0,2050	-	-
	Peniche	Mês	8	3,5803	25,2	< 0,001
		Residual	81	0,1422	-	-
GSI	Matosinhos	Mês	8	55,862	13,7	< 0,001
		Residual	81	4,084	-	-
	Aveiro	Mês	8	156,408	44,7	< 0,001
		Residual	81	3,498	-	-
	Peniche	Mês	8	191,939	29,1	< 0,001
		Residual	81	6,589	-	-

3.3. Variabilidade natural nas respostas bioquímicas

A análise de correlação (tabela 5) revelou uma fraca associação entre o índice de condição (K) e a AChE e uma forte associação deste índice com a LDH. O GSI apresentou uma relação significativamente inversa com a CAT, GST (fígado) e GST (brânquias), o que sugere que o ciclo

reprodutor parece ter repercussão nos perfis enzimáticos. A CAT, apesar de ser uma enzima hepática, não apresentou nenhuma relação com os índices de condição do fígado (HSI e K (liver)); o contrário verificou-se para as GST (brânquias e fígado). A associação positiva das GSTs com todos os índices testados é independente de estas terem sido doseadas no fígado ou nas brânquias.

Tabela 5: Quadro-resumo das associações entre o estado alimentar, reprodutivo e fisiológico (K, K (gut), K (liver), GSI e HSI) e os biomarcadores enzimáticos (GST (brânquias), GST (fígado), AChE, CAT e LDH) em sardinha (*Sardina pilchardus*). Apenas são apresentadas as correlações significativas, indicando o valor do coeficiente de correlação (r) e probabilidade associada (p). ns – representa “não significativo” e ‘n’ representa o número de amostras.

	AChE	LDH	CAT (log)	GST (brânquias) (log)	GST (fígado) (log)
K	r = - 0,17 p = 0,006 n = 268	r = 0,44 p < 0,001 n = 258	ns	r = 0,21 p < 0,001 n = 269	r = 0,28 p < 0,001 n = 256
K (gut) (log)	ns	ns	r = 0,29 p < 0,001 n = 249	r = 0,59 p < 0,001 n = 269	r = 0,64 p < 0,001 n = 256
K (liver) (log)	ns	ns	ns	r = 0,40 p < 0,001 n = 269	r = 0,57 p < 0,001 n = 256
HSI (log)	ns	ns	ns	r = 0,37 p < 0,001 n = 269	r = 0,54 p < 0,001 n = 256
GSI (log)	ns	r = 0,20 p = 0,001 n = 258	r = - 0,48 p < 0,001 n = 249	r = - 0,55 p < 0,001 n = 269	r = - 0,54 p < 0,001 n = 256

Os dados das correlações, por local de amostragem (tabela 6), revelaram que, na maior parte dos casos, as associações encontradas entre as variáveis bioquímicas (biomarcadores enzimáticos) e fisiológicas (condição e estado reprodutivo) foram consistentes entre locais. Uma notória exceção foi a associação entre o índice de condição (K) e a AChE, pois apenas na população de Peniche foi observada uma relação significativa entre estas variáveis. Em menor escala, foi observado um ou outro caso em que não se verificavam associações significativas numa das populações (e.g. GST nas brânquias versus índices de condição hepática na população de Aveiro; LDH versus GSI na população de Matosinhos).

Tabela 6: Quadro-resumo das associações entre o estado alimentar, reprodutivo e fisiológico (K, K (gut), K (liver), GSI e HSI) e os biomarcadores enzimáticos (GST (brânquias), GST (fígado), AChE, CAT e LDH), por local de amostragem, em sardinha (*Sardina pilchardus*). Apenas são apresentadas as correlações significativas, indicando o valor do coeficiente de correlação (r) e probabilidade associada (p). ns – representa “não significativo” e ‘n’ representa o número de amostras.

	Local	AChE	LDH	CAT (log)	GST (brânquias) (log)	GST (fígado) (log)
K	Matosinhos	r = - 0,14 p = 0,197 n = 90	r = 0,58 p < 0,001 n = 88	ns	r = 0,12 p = 0,255 n = 90	r = 0,11 p = 0,312 n = 87
	Aveiro	r = - 0,03 p = 0,755 n = 89	r = 0,3 p = 0,006 n = 84	ns	r = 0,25 p = 0,016 n = 90	r = 0,29 p = 0,008 n = 85
	Peniche	r = - 0,29 p = 0,006 n = 89	r = 0,49 p < 0,001 n = 86	ns	r = 0,28 p = 0,007 n = 89	r = 0,45 p < 0,001 n = 84
K (gut) (log)	Matosinhos	ns	ns	r = 0,35 p = 0,001 n = 83	r = 0,45 p < 0,001 n = 90	r = 0,48 p < 0,001 n = 87
	Aveiro	ns	ns	r = 0,36 p < 0,001 n = 83	r = 0,45 p < 0,001 n = 90	r = 0,49 p < 0,001 n = 85
	Peniche	ns	ns	r = 0,24 p = 0,032 n = 83	r = 0,75 p < 0,001 n = 89	r = 0,8 p < 0,001 n = 84
K (liver) (log)	Matosinhos	ns	ns	ns	r = 0,38 p < 0,001 n = 90	r = 0,52 p < 0,001 n = 87
	Aveiro	ns	ns	ns	r = 0,1 p = 0,334 n = 90	r = 0,42 p < 0,001 n = 85
	Peniche	ns	ns	ns	r = 0,54 p < 0,001 n = 89	r = 0,69 p < 0,001 n = 84
HSI (log)	Matosinhos	ns	ns	ns	r = 0,39 p < 0,001 n = 90	r = 0,55 p < 0,001 n = 87
	Aveiro	ns	ns	ns	r = 0,07 p = 0,537 n = 90	r = 0,31 p = 0,004 n = 85
	Peniche	ns	ns	ns	r = 0,52 p < 0,001 n = 89	r = 0,67 p < 0,001 n = 84
GSI (log)	Matosinhos	ns	r = - 0,06 p = 0,601 n = 88	r = - 0,40 p < 0,001 n = 83	r = - 0,40 p < 0,001 n = 90	r = - 0,46 p < 0,001 n = 87
	Aveiro	ns	r = 0,31 p = 0,004 n = 84	r = - 0,51 p < 0,001 n = 83	r = - 0,49 p < 0,001 n = 90	r = - 0,36 p < 0,001 n = 85
	Peniche	ns	r = 0,29 p = 0,008 n = 86	r = - 0,49 p < 0,001 n = 83	r = - 0,79 p < 0,001 n = 89	r = - 0,78 p < 0,001 n = 84

Discussão e Conclusões

4. Discussão e Conclusões

O objectivo do presente trabalho foi avaliar se o uso de biomarcadores, enquanto ferramenta de avaliação da exposição a contaminantes, pode ser de algum modo afectado pela variabilidade natural. Portanto, pretendeu-se perceber se a população/zona geográfica de proveniência distinta (Aveiro, Matosinhos e Peniche) e o ciclo de vida/sazonalidade da espécie em estudo, sardinha, durante um período de nove meses, afectava a resposta ao nível dos biomarcadores adoptados. Para tal, utilizaram-se quatro biomarcadores, CAT, GSTs, LDH e AChE, e ainda a quantificação de várias métricas indicativas do estado nutricional, fisiológico, e reprodutivo, nomeadamente, K, K (gut), K (liver), HSI e GSI. No final do período de amostragem de nove meses (compreendido entre Maio'10 e Janeiro'11), verificou-se a ocorrência de variabilidade nos dados dos biomarcadores e dos índices quantificados em *Sardina pilchardus*, em todos os locais amostrados. O principal factor contribuidor para a variação dos dados foi o mês de colheita (i.e. componente sazonal), e os dados obtidos parecem indicar que o ciclo reprodutor foi a principal fonte de variabilidade. Assim, os três locais amostrados seguiram as mesmas tendências ao longo do tempo, comprovando que as respostas obtidas são devidas ao ciclo reprodutivo e não à eventual contaminação de que pudessem ter sido alvo. Apesar de a contaminação poder influenciar a resposta dos biomarcadores, neste estudo não parece representar o factor responsável pela variabilidade verificada, pois é improvável que exista o(s) mesmo(s) foco(s) e padrões de contaminação nos três locais amostrados ao longo tempo.

4.1. Estado nutricional, fisiológico e reprodutivo

O estado reprodutivo, o grau de robustez e o armazenamento de energia podem ser expressos através do GSI, HSI e K, respectivamente (Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011). Através destes é possível deduzir bastante informação que foi útil no actual estudo.

Os dados obtidos corroboram o estudo de Chícharo (1998), que refere que *Sardina pilchardus* possui duas épocas de desova na nossa costa, uma no Inverno (no mês de Dezembro) e outra na estação da Primavera (entre os meses de Abril e Maio). Assim, no mês de Novembro – Dezembro a diminuição do GSI parece reflectir uma das épocas de desova, que havia sido precedida por uma intensa acumulação de reservas no fígado (Julho – Setembro), traduzida no incremento do HSI e K (liver). A época de desova conduz a elevados custos energéticos que são, provavelmente, apoiados pelas reservas de gordura acumuladas durante a fase de descanso da

reprodução e pela actividade alimentar durante a época de desova (Garrido *et al.*, 2008). Assim, após um período de desova e consequente diminuição do GSI, existe o período de descanso de ovário, onde o peixe melhora a sua condição (Kleinkauf *et al.*, 2004). A disponibilidade de alimentos durante a fase de descanso influencia a quantidade de reservas acumuladas antes da época de desova e, portanto, terá impacto na reprodução (Garrido *et al.*, 2008). A variação sazonal no teor de gordura da sardinha está ligada à sua localização temporal na época de desova e, portanto, o estado de maturação das gónadas poderá estar relacionado com a sazonalidade da dieta, para além de variações de temperatura da água (Garrido *et al.*, 2008; Gantias, 2009).

O fígado dos peixes funciona como um órgão de armazenamento temporário de lípidos e glicogénio, logo prevê-se que o fígado aumente de tamanho antes da época de desova (Kleinkauf *et al.*, 2004; Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011). Os lípidos e os seus constituintes ácidos gordos são, juntamente com as proteínas, os principais constituintes orgânicos dos peixes (Tocher, 2003). Em particular, os ácidos gordos possuem um papel importante no armazenamento e fornecimento de energia metabólica, sob a forma de ATP. Os ácidos gordos são a base para o crescimento, reprodução e migração (Tocher, 2003). Portanto, para uma reprodução bem-sucedida, o teor em ácidos gordos armazenados deve sustentar tanto as necessidades energéticas dos peixes como também da descendência (Tocher, 2003).

Neste sentido, os baixos valores dos índices de condição hepática, após e durante a reprodução, podem resultar da transferência de reservas de energias do fígado para a maturação das gónadas e eventos reprodutivos (Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011). Assim, após a conclusão da gametogénese e desova, os produtos armazenados no fígado diminuem drasticamente, levando à diminuição do peso do fígado e consequentemente dos índices de condição hepática, nomeadamente o HSI e K (liver) (Kleinkauf *et al.*, 2004; Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011). No presente trabalho, concluiu-se que as reservas hepáticas apresentam uma forte associação com o índice gonadossomático, na medida em que GSI e HSI associam-se inversamente ($r = -0,49$; $p < 0,001$), o que se traduz em todos os locais amostrados. O índice GSI foi mínimo de Junho a Agosto, aumentando a partir desse mês até atingir o pico máximo em Novembro – Dezembro. Este padrão foi consistente entre locais, com excepção de Matosinhos que não apresentou uma subida tão intensa durante o Inverno.

Como anteriormente referido, existe uma forte associação entre a desova e a alimentação, pois um aumento no índice gonadossomático ocorre após um período de elevada disponibilidade alimentar. Estes dados são apoiados pelo índice de condição do intestino, K (gut), onde se verificou um pico significativo em Julho – Agosto e a partir desse mês o decréscimo do índice (K (gut)). O estudo de Coelho (2002) indica que o período de Julho a Setembro proporciona as melhores condições de alimentação da sardinha, uma vez que é quando se intensifica as condições de

upwelling, o que leva a elevadas concentrações de fito- e zooplâncton. As sardinhas alimentam-se intensivamente na fase de descanso da reprodução; no entanto, durante a desova também se podem alimentar, mas todos os nutrientes obtidos são provavelmente mobilizados para as gónadas, não sendo acumulados nos órgãos/tecidos de reserva (Garrido *et al.*, 2008). Os resultados alcançados foram corroborados por estudos anteriores, onde em todas as populações de *Sardina pilchardus* estudadas, a actividade reprodutiva apresenta sazonalidade inversa com a condição somática, e a acumulação de reservas de gordura principalmente no Verão (Silva *et al.*, 2006; Ganius, 2009).

No presente estudo, a análise de correlação entre os biomarcadores e os vários índices do estado fisiológico e reprodutivo revelaram uma associação significativa, o que confirma enorme influência do ciclo reprodutivo na actividade das várias enzimas usadas como biomarcadores (ver também ponto seguinte). A actividade da LDH apresentou indícios de estar relacionada com o factor de condição (K) e com o GSI, por sua vez as actividades tanto da CAT como das GSTs relacionaram-se com o GSI e K (gut); no caso das GSTs, estas apresentaram relação com o HSI e também com o estado nutricional (K e K (liver)). Vários factores abióticos e bióticos são conhecidos por afectar a resposta dos biomarcadores (Napierska *et al.*, 2009). Factores como a disponibilidade de alimento, o estado reprodutivo, a saúde, o sexo, a idade, a actividade metabólica, o comportamento migratório, a densidade populacional e factores relacionados com os níveis de poluentes nos tecidos podem variar durante o ano (Stanic *et al.*, 2006; Vidal-Liñán *et al.*, 2010). Portanto, alterações nas actividades dos biomarcadores podem ser simplesmente devidas ao ciclo fisiológico natural das espécies, não estando relacionados com exposição à poluição química (Sheehan e Power, 1999; Vidal-Liñán *et al.*, 2010).

4.2. Biomarcadores

A actividade da AChE não seguiu um padrão consistente entre os locais amostrados ao longo dos meses, tendo sido muito irregular. Alguns estudos sugerem a possibilidade da AChE se relacionar com variações sazonais (Vidal *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2004; Leiniö e Lehtonen, 2005; Sarkar *et al.*, 2006; Bocchetti *et al.*, 2008). A temperatura surge como o factor que mais interfere com a actividade da AChE e não a idade, o sexo ou o período reprodutivo do organismo (Leiniö e Lehtonen, 2005). No entanto, os dados obtidos neste estudo não revelam um padrão claro na actividade da AChE.

A actividade da LDH aumentou progressivamente a partir de Maio, de forma relativamente consistente em todos os locais amostrados, tendo atingido um máximo em Setembro e decrescido continuamente até Janeiro. Vários estudos referem que a variação na actividade da LDH pode ser

influenciada pelo aumento da temperatura da água, o que leva à redução das concentrações de oxigénio dissolvido (Thébault, 1984; Wu e Lam, 1997; Diamantino *et al.*, 2001; Nathan *et al.*, 2006; Douhri e Sayah, 2009). A enzima dá continuidade à glicólise em condições de hipóxia, utilizando-se assim a sua actividade para avaliar o estado metabólico do organismo (Moreira *et al.*, 2006). Neste sentido, os dados obtidos podem reflectir o aumento da temperatura da água e consequente diminuição de oxigénio, pois a actividade da LDH aumenta durante todo o Verão. Por outro lado, observou-se que a LDH se encontra relacionada com o GSI. Segundo os dados apresentados por Chatzifotis *et al.* (2011), o aumento da actividade da LDH no fígado encontra-se relacionado com o processo de maturação das gónadas, ou seja, o peixe poderá necessitar de energia adicional para iniciar a maturação. Uma outra razão apresentada por Chatzifotis *et al.* (2011) para o aumento da actividade da LDH é a diminuição das reservas alimentares e o peixe necessitar de energia adicional para se manter activo.

A actividade da catalase foi significativamente superior no período entre Maio – Junho. Vários autores referem que a actividade da CAT pode estar relacionada com variações sazonais (Regoli, 1998; Sheehan e Power, 1999; Vidal *et al.*, 2002; Au, 2004; Leiniö e Lehtonen, 2005; Vidal-Liñán *et al.*, 2010). Segundo Vidal-Liñán *et al.* (2010) a actividade da CAT pode ser influenciada pelo estado nutritivo e reprodutivo. A principal actividade da CAT está associada com os peroxissomas, que têm como função o metabolismo de ácidos gordos (Huggett *et al.* 1992). Assim, durante a β -oxidação dos ácidos gordos, H_2O_2 é produzido como um subproduto e a CAT surge para remover o peróxido de hidrogénio (Huggett *et al.* 1992; Au, 2004). Logo, uma elevada disponibilidade de alimentos conduz à intensificação do metabolismo para uma absorção eficiente dos mesmos. Consequentemente leva a um aumento de oxirradicais durante o catabolismo das substâncias ingeridas, o que se traduz num aumento da CAT (Regoli, 1998; Vidal *et al.*, 2002; Leiniö e Lehtonen, 2005).

Como descreve Pavlović *et al.* (2010) a redução da actividade da CAT poderá ser devido a mudanças na temperatura (para valores mais baixos), à baixa disponibilidade de alimento e a maturação das gónadas. Os dados obtidos através das correlações entre a CAT relativamente ao GSI e K (gut) corroboram parcialmente o estudo de Pavlović *et al.* (2010). Pelo contrário, o aumento da temperatura estimula o processo metabólico (Lushchak, 2011). Consequentemente, o aumento de consumo de oxigénio poderá levar a um aumento de produção de ROS, como produtos secundários do metabolismo intensificado, resultando em *stress* oxidativo (Lushchak, 2011). Logo, um aumento de defesas antioxidantes surge como uma resposta adaptativa de eliminar os ROS produzidos.

Tal como mencionado anteriormente para o caso da CAT, o mesmo padrão sucede na actividade das GSTs, pois estas são também determinantes em cenários de *stress* oxidativo, para

além de enzimas de biotransformação. Logo, o aumento do metabolismo, o aumento da ingestão de alimento, a mobilização dos ácidos gordos para os ovos e o aumento do consumo de oxigénio levam ao surgimento de ROS e à formação de compostos electrofílicos, e a actividade das GSTs funciona como um agente que previne os seus efeitos. A glutathione-S-transferases, no fígado e nas brânquias, foram significativamente superiores no período de Maio a Agosto; contudo este padrão foi menos consistente nas amostras de Aveiro. Entre os meses de Setembro a Janeiro, a actividade diminuiu consideravelmente nos três locais. Os dados sugerem uma dependência deste padrão em relação à acumulação de reservas e época de desova (correlações significativas entre a actividade das GSTs e HSI e GSI, e factores de condição). De acordo com vários autores, as variações presentes na actividade das GSTs podem estar relacionadas com variações sazonais (Regoli, 1998; Kaaya *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2002; Manduzio *et al.*, 2004; Leiniö e Lehtonen, 2005). Elevados valores da actividade das GSTs podem coincidir com o restabelecer de reservas e períodos de gametogénese; por outro lado, baixos valores coincidem com períodos de desova (Kaaya *et al.*, 1999). O presente estudo encontra-se de acordo com a literatura (Kaaya *et al.*, 1999), pois em Setembro, quando a actividade das GSTs se encontra diminuída, o HSI, o K, o K (gut) e o K (liver) também diminuem, ao contrário do GSI que começa a aumentar. A actividade das GSTs do fígado encontra-se relacionada com a condição do órgão em questão; assim quando a condição do fígado diminui, isto é o K (liver) e o HSI decrescem, a actividade enzimática decresce (Larose *et al.*, 2008). Manduzio *et al.* (2004) refere ainda que a temperatura e a disponibilidade de alimento induzem o consumo de oxigénio e a geração de oxirradicais celulares, o qual irá ser compensado por um aumento de defesas antioxidantes, o que se verifica nos dados obtidos sensivelmente entre os meses de Julho-Agosto.

É importante salientar que em estudos de campo é bastante complicado distinguir qual destes efeitos mencionados é mais importante. São necessários estudos detalhados para perceber o papel da acumulação de reservas (pré-desova) e a geração de radicais livres (aumento do metabolismo devido a maior temperatura, aumento da disponibilidade de oxigénio na água e maior disponibilidade de alimento). No entanto, os nossos dados sugerem que a diminuição brusca das GSTs parece encontrar-se mais associada a uma transição da produção de reservas (pré-desova) para um mecanismo de alocação de energia para a reprodução (gametogénese e desova). Curiosamente, este padrão foi observado nas GSTs quer do fígado, quer das brânquias (que não são um órgão de reserva). Estas conclusões sugerem um aumento da intensidade do metabolismo lipídico, nomeadamente β -oxidação dos ácidos gordos, com conseqüente aumento de ROS, e a actividade das GSTs surge como um elemento de eliminação de ROS. O mesmo sucede na CAT, como anteriormente referido, pois durante a β -oxidação dos ácidos gordos, H_2O_2 é produzido e a CAT surge para remove-lo. Uma explicação também plausível para o aumento da actividade das

GSTs é o aumento do metabolismo produzir mais compostos electrofílicos e maior necessidade de conjugação com a GSH (Wang e Ballatori, 1998).

4.3. Conclusões

A escolha deste conjunto de biomarcadores foi motivada pelo facto de terem já sido aplicados com sucesso, no campo e em laboratório, na avaliação do impacto da poluição. Portanto, formam um conjunto relevante para biomonitorização da presença de agentes xenobióticos no ambiente (Kaaya *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2006; Napierska *et al.*, 2009; Douhri e Sayah, 2009; Sheehan e Power, 1999; Vidal-Liñán *et al.*, 2010). A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os factores ambientais e biológicos (a disponibilidade de alimentos, o ciclo reprodutivo, entre outros) parecem influenciar os níveis dos biomarcadores analisados. Assim, os planos de biomonitorização devem ser cuidadosos na análise dos dados obtidos a partir de diferentes órgãos, locais e épocas do ano (Regoli, 1998). Idealmente, os organismos de estudo deveriam ser de tamanho similar, a razão entre sexos equilibrada e amostrados na mesma época do ano (Solé *et al.*, 2008).

No presente estudo, a variabilidade natural em relação aos factores abióticos (temperatura, alimento, entre outros) parece ser mais pronunciada do que o efeito de uma possível contaminação. No entanto, e considerando que fosse possível descartar os efeitos de variação sazonal, torna-se necessário equacionar que respostas se poderiam avaliar. A questão permanece, pois não é possível determinar se existiria (ou não) um sinal mensurável, decorrente da exposição aos contaminantes, que fosse exequível de avaliar com estas ferramentas. A análise dos biomarcadores e dos índices indicativos do estado nutricional, fisiológico, e reprodutivo permitiu detectar uma relativa variação entre as amostras de *Sardina pilchardus*. As respostas fornecidas evidenciam que a condição de *Sardina pilchardus* pode ser modificada por variáveis naturais. Contudo, não foi perceptível uma relação com fontes de contaminação. Assim, sem pretender diminuir a importância da adopção de biomarcadores, que a presente tese corrobora, os dados obtidos com baterias de biomarcadores têm, obrigatoriamente, de ser complementados com informação química (natureza causal da contaminação), resultante da quantificação dos contaminantes xenobióticos na água, sedimentos e nos tecidos dos peixes nos locais amostrados. Paralelamente, fica reforçada a importância de acompanhar os marcadores bioquímicos com medidas avaliadoras do estado fisiológico, reprodutivo e nutricional dos organismos; só com a integração de toda a informação (biomarcadores – potencial efeito; caracterização química – potencial causa; condição do peixe – potencial covariável).

No futuro, seria interessante estudar outras espécies piscícolas selvagens, com relevância económica e ambiental, com as mesmas ferramentas agora usadas e juntamente com análises químicas para contaminantes. Em futuras pesquisas é imprescindível não esquecer variáveis, que podem variar significativamente ao longo do ano e que não se encontram relacionadas com a poluição. Estas variáveis podem exercer um impacto adicional sobre os sistemas enzimáticos e interferir com a resposta de biomarcadores (como a disponibilidade de nutrientes, estado reprodutivo, entre outros) (Sheehan e Power, 1999), funcionando como covariáveis que devem ser consideradas na análise dos dados bioquímicos. Caso não o sejam, isso representa uma limitação importante na interpretação dos dados, pois a resposta obtida pode ser apenas uma resposta normal do ciclo fisiológico ou reprodutivo das espécies e ser completamente alheia à exposição de contaminantes. Assim, para o uso correcto dos biomarcadores é essencial conhecer as gamas de variação natural e os seus níveis nas populações que habitam a área geográfica em estudo (Vidal-Liñán *et al.*, 2010).

Como já mencionado, o alvo escolhido para este estudo foram peixes da espécie *Sardina pilchardus*. Os peixes são úteis na biomonitorização pois podem acumular contaminantes persistentes e exibir respostas adaptativas a essas exposições (Fang *et al.*, 2009). A debilitação dos peixes causada por xenobióticos pode ser usada como uma medida integrante de exposição a *stress* químico (Gopalakrishnan *et al.*, 2011). Deste modo, os peixes podem servir como sentinelas (Gopalakrishnan *et al.*, 2011). Segundo a DGPA (Direcção Geral das Pescas e Aquicultura) a sardinha é a espécie de cerco com maior desembarque no Continente Português. Esta espécie é bastante apreciada por parte dos consumidores, exibindo uma considerável importância comercial. Diversos estudos têm sido feitos com *Sardina pilchardus*, incluindo análises do ciclo de reprodução (Amenzoui *et al.*, 2006), a condição nutricional de larvas (Chícharo, 1998), as reacções de *stress* sofridas aquando da pesca de cerco (Marçalo *et al.*, 2006), a análise da alometria do ovário e no uso do índice gonossomático (Somarakis *et al.*, 2004), os factores genéticos (Ramon e Castro, 1997; Gonzalez e Zardoya, 2007), o efeito das reservas de gordura materna na composição de ácidos gordos de oócitos (Garrido *et al.*, 2007), em bactérias associadas aos ovos de sardinha (Míguez e Combarro, 2003), entre muitos outros. Portanto, sendo a sardinha um dos recursos pesqueiros mais importantes de Portugal, é importante realizar a sua monitorização, em termos dos potenciais efeitos de contaminantes. Caso as sardinhas se encontrem de algum modo afectadas pela contaminação aquática, poderão afectar os consumidores que delas se alimentam e subquentemente comprometer a qualidade e economia piscatória da espécie. Assim, é imprescindível haver uma investigação na vertente da biomonitorização de contaminantes na espécie, atendendo ao impacto socioeconómico mencionado. Este estudo pretendeu dar uma primeira contribuição para esse tipo

de estudos, abrangendo a variabilidade sazonal de alguns biomarcadores e covariáveis explicativas dessa variabilidade.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

- Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **6**: 105–121.
- Amenzoui K, Ferhan-Tachinante F, Yahyaoui A, Kifani S, Mesfioui AH (2006). Analysis of the cycle of reproduction of *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) off the Moroccan Atlantic coast. *Comptes rendus Biologies* **329**: 892–901.
- Antunes SC, Marques SM, Pereira R, Gonçalves F, Nunes B (2009). Testing procedures for the determination of several biomarkers in different species, for environmental assessment of pollution. *Journal of Environmental Monitoring* **12**: 1625–1630.
- Au DWT (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* **48**: 817–834.
- Bacelar FS, Dueri S, Hernández-García E, Zaldívar J-M (2009). Joint effects of nutrients and contaminants on the dynamics of a food chain in marine ecosystems. *Mathematical Biosciences* **218**: 24–32.
- Ballón M, Wosnitza-Mendo C, Guevara-Carrasco R, Bertrand A (2008). The impact of overfishing and El Niño on the condition factor and reproductive success of Peruvian hake, *Merluccius gayi peruanus*. *Progress in Oceanography* **79**: 300-307.
- Beauvais SL, Jones SB, Parris JT, Brewer SK, Little EE (2001). Cholinergic and Behavioral Neurotoxicity of Carbaryl and Cadmium to Larval Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **49**: 84-90
- Bocchetti R, Lamberti CV, Pisanelli B, Razzetti EM, Maggi C, Catalano B, Sesta G, Martuccio G, Gabellini M, Regoli F (2008). Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine Environmental Research* **66**: 24–26.
- Bocquené G, Bellanger C, Cadiou Y, Galgani F (1995). Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* **4**: 266-279.
- Bozcaarmutlu A, Sapmaz C, Aygun Z, Arinc E (2009). Assessment of pollution in the West Black Sea Coast of Turkey using biomarker responses in fish. *Marine Environmental Research* **67**: 167–176.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.

- Bresler V, Bissinger V, Abelson A, Dizer H, Sturm A, Kratke R, Fishelson L, Hansen PD (1999). Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgoland Marine Research* **53**: 219–243.
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* **247**: 295-311.
- Castro BB (2001). Sensibilidade e relevância ecológica de ensaios ecotoxicológicos para avaliação de risco em locais contaminados. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra, 78pp.
- Chatzifotis S, Papadaki M, Despoti S, Roufidou C, Antonopoulou E (2011). Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **316**: 53–59.
- Cheung CCC, Zheng GJ, Lam PKS, Richardson BJ (2002). Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* **45**: 181–191.
- Chi Z, Liu R, Zhang H (2010). Potential enzyme toxicity of oxytetracycline to catalase. *Science of the Total Environment* **408**: 5399–5404.
- Chícharo MA (1998). Nutritional condition and starvation in *Sardina pilchardus* (L.) larvae off southern Portugal compared with some environmental factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **225**: 123–137.
- Choudhury C, Ray AK, Bhattacharya S, Bhattacharya S (1993). Non lethal concentrations of pesticide impair ovarian function in the freshwater perch, *Anabas testudineus*. *Environmental Biology of Fishes* **36**: 319-324.
- Coelho CSFG (2002). Alimentação de *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) ao largo da costa continental portuguesa e implicações da condição nutricional das fêmeas na qualidade dos oócitos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Instituto das Pescas e do Mar.
- Committee on Biological Markers of the National Research Council (1987). Biological Markers in Environmental Health Research. *Environmental Health Perspectives* **74**: 3-9.
- Costa PR e Garrido S (2004). Domoic acid accumulation in the sardine *Sardina pilchardus* and its relationship to *Pseudo-nitzschia* diatom ingestion. *Marine ecology progress series* **284**: 261–268.

- Cury P, Bakun A, Crawford RJM, Jarre A, Quiñones R A, Shannon LJ, Verheye HM (2000). Small pelagics in upwelling systems: patterns of interaction and structural changes in “wasp-waist” ecosystems. *Journal of Marine Science* **57**: 603–618.
- De Azevedo FA e Chasin AAM (2004). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. RiMa e InterTox, São Paulo, capítulo 2.
- Diamantino TC, Almeida E, Soares AMVM, Guilhermino L (2001). Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere* **45**: 553-560.
- Doglioli AM, Magaldi MG, Vezzulli L, Tucci S (2004). Development of a numerical model to study the dispersion of wastes coming from a marine fish farm in the Ligurian Sea (Western Mediterranean). *Aquaculture* **231**: 215–235.
- Domingues I, Agra AR, Monaghan K, Soares AMVM, Nogueira AJA (2010). Cholinesterase and glutathione-s-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**: 5-18.
- Douhri H e Sayah F (2009). The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier’s bay (Morocco). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**: 394–399.
- Durieux EDH, Farver TB, Fitzgerald PS, Eder KJ, Ostrach DJ (2011). Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiology and Biochemistry* **37**: 21–29.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**: 88-95.
- Fang JKH, Au DWT, Wu RSS, Chan AKY, Mok HOL, Shin PKS (2009). The use of physiological indices in rabbitfish *Siganus oramin* for monitoring of coastal pollution. *Marine Pollution Bulletin* **58**: 1229-1244.
- Fischer P, Rademacher K, Kils U (1992). *In situ* investigations on the respiration and behaviour of the eelpout *Zoarces viviparous* under short-term hypoxia. *Marine ecology progress series* **88**: 181-184.
- Fonseca VF, França S, Serafim A, Company R, Lopes B, Bebianno MJ, Cabral HN (2011). Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic Toxicology* **102**: 216–227.
- Friedmann AS, Watzinb MC, Brinck-Johnsen T, Leiter JC (1996). Low levels of dietary methylmercury inhibit growth and gonadal development in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquatic Toxicology* **35**: 265-278.

- Galloway T e Handy R (2003). Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicology* **12**: 345-363.
- Ganias K (2009). Linking sardine spawning dynamics to environmental variability. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **84**: 402–408.
- García-de la Parra LM, Bautista-Covarrubias JC, Rivera-de la Rosa N, Betancourt-Lozano M, Guilhermino L (2006). Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**: 372–380.
- Garrido S, Rosa R, Ben-Hamadou R, Cunha ME, Chícharo MA, Van der Lingen CD (2007). Effect of maternal fat reserves on the fatty acid composition of sardine (*Sardina pilchardus*) oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **148**: 398–409.
- Garrido S, Rosa R, Ben-Hamadou R, Cunha ME, Chícharo MA, van der Lingen CD (2008). Spatio-temporal variability in fatty acid trophic biomarkers in stomach contents and muscle of Iberian sardine (*Sardina pilchardus*) and its relationship with spawning. *Marine Biology* **154**: 1053-1065.
- Gonzalez EG e Zardoya R (2007). Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). *BMC Evolutionary Biology* **7**: 1-12.
- Gopalakrishnan S, Nai Z, Thilagam H, Bei C, Ding J, Wang X-H, Wang W-X, Ke C-H, Giesy JP, Zhang X, Wang K-J (2011). Biochemical responses and DNA damage in red sea bream from coastal Fujian Province, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, article in press.
- Guilhermino L, Lopes MC, Carvalho AP, Soares AMVM (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* **32**: 727–738.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S transferases. *Journal of Biological Chemistry* **249**: 7130-7137.
- Hagger JA, Galloway TS, Langston WJ, Jones MB (2009). Application of biomarkers to assess the condition of European Marine Sites. *Environmental Pollution* **157**: 2003-2010.
- Hanson N (2008). Does Fish Health Matter? The Utility of Biomarkers in Fish for Environmental Assessment. Dissertação de Doutorado, Universidade de Gothenburg, Suécia.
- Holsbeek L, Joiris CR, Debacker V, Ali IB, Roose P, Nellissen JP, Gobert S, Bouquegneau JM, Bossicar M (1999). Heavy Metals, Organochlorines and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sperm Whales Stranded in the Southern North Sea During the 1994/1995 Winter. *Marine Pollution Bulletin* **38**: 304-313.

- Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle-Jr. PM, Bergman HL (1992). Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, USA, capítulo 1-2, 6.
- Hyne RV e Maher WA (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **54**: 366–374.
- ICES (2008). Report of the Workshop on Small Pelagics (*Sardina pilchardus*, *Engraulis encrasicolus*) maturity stages (WKSPMAT), 10–14 November 2008, Mazara del Vallo, Italy. ICES CM 2008/ACOM: 40-82 pp.
- Kaaya A, Najimi S, Ribera D, Narbonne JF, Moukrim A (1999). Characterization of Glutathione S-Transferases (GST) activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* used as a biomarker of pollution in the Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **62**: 623-629.
- Klaassen CD (2001). Casarett and Doull's. Toxicology: The basic science of poisons. McGraw-Hill Companies, USA, capítulo 6, 29.
- Kleinkauf A, Connor L, Swarbreck D, Levene C, Walker P, Johnson PJ, Leah RT (2004). General condition biomarkers in relation to contaminant burden in European flounder (*Platichthys flesus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **58**: 335–355
- Lam PKS e Gray JS (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* **46**: 182–186.
- Larose C, Canuel R, Lucotte M, Giulio RTD (2008). Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest. *Comparative Biochemistry and Physiology* **147**: 139–149.
- Lau PS, Wong HL, Garrigues Ph (2004). Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. *Continental Shelf Research* **24**: 1969–1987.
- Leiniö S e Lehtonen KK (2005). Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology* **140**: 408 - 421.
- Li Z-H, Li P, Randak T (2010). Effect of a human pharmaceutical carbamazepine on antioxidant responses in brain of a model teleost in vitro: an efficient approach to biomonitoring. *Journal of Applied Toxicology* **30**: 644-648.
- Li Z-H, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, Kolarova J, Li P, Randak T (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**: 319–327.

- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Pascariello MF, Marinosci L, Schettino T (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin* **46**: 324–330.
- Lushchak VI (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* **101**: 13–30.
- Malins DC, Anderson KM, Stegeman JJ, Jaruga P, Green VM, Gilman NK, Dizdaroglu M (2006). Biomarkers Signal Contaminant Effects on the Organs of English Sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound. *Environmental Health Perspectives* **114**: 823-829.
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B (2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione *S*-transferase. *Aquatic Toxicology* **70**: 83–93.
- Marçalo A, Mateus L, Correia JHD, Serra P, Fryer R, Stratoudakis Y (2006). Sardine (*Sardina pilchardus*) stress reactions to purse seine fishing. *Marine Biology* **149**: 1509–1518.
- Martínez-Gómez C, Campillo JA, Benedicto J, Fernández B, Valdés J, García I, Sánchez F (2006). Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin* **53**: 305–314.
- Martínez-Gómez C, Fernández B, Valdés J, Campillo JA, Benedicto J, Sánchez F, Vethaak AD (2009). Evaluation of three-year monitoring with biomarkers in fish following the *Prestige* oil spill (N Spain). *Chemosphere* **74**: 613–620.
- Míguez B e Combarro MP (2003). Bacteria associated with sardine (*Sardina pilchardus*) eggs in a natural environment (Ría de Vigo, Galicia, northwestern Spain). *FEMS Microbiology Ecology* **44**: 329-334.
- Montavon P, Kukic KR, Bortlik K (2007). A simple method to measure effective catalase activities: Optimization, validation, and application in green coffee. *Analytical Biochemistry* **360**: 207–215.
- Moreira SM, Lima I, Ribeiro R, Guilhermino L (2006). Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: Laboratory and in situ assays. *Aquatic Toxicology* **78**: 186–201.
- Napierska D, Baršienė J, Mulkiewicz E, Podolska M, Rybakovas A (2009). Biomarker responses in flounder *Platichthys flesus* from the Polish coastal area of the Baltic Sea and applications in biomonitoring. *Ecotoxicology* **18**: 846–859.

- Nathan SS, Kalaivani K, Murugan K (2006). Effect of biopesticides on the lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**: 102–107.
- Newman MC (2001). Fundamentals of Ecotoxicology. Lewis Publishers, USA, capítulo 3, 6.
- Nunes B (2011). The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **212**: 29-59.
- Nunes B, Carvalho F, Guilhermino L (2005). Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **20**: 369–376.
- Nunes B, Gaio AR, Carvalho F, Guilhermino L (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **71**: 341–354.
- Palomera I, Olivar MP, Salat J, Sabatés A, Coll M, García A, Morales-Nin B (2007). Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: An ecological review. *Progress in Oceanography* **74**: 377–396.
- Pavlović SZ, Mitić SSB, Radovanović TB, Perendija BR, Despotović SG, Gavrić JP, Saičić ZS (2010). Seasonal Variations of the Activity of Antioxidant Defense Enzymes in the Red Mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. *Marine Drugs* **8**: 413-428.
- Peixoto F, Alves-Fernandes D, Santos D, Fontainhas-Fernandes A (2006). Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **85**: 91–96.
- Pennec GL, Pennec ML (2003). Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquatic Toxicology* **64**: 131- 142.
- Ramon MM e Castro JA (1997). Genetic variation in natural stocks of *Sardina pilchardus* (sardines) from the western Mediterranean Sea. *Heredity* **78**: 520-528.
- Ré PMAB (1984). Ictioplâncton da região central da costa portuguesa e do estuário do Tejo. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Regoli F (1998). Trace Metals and Antioxidant Enzymes in Gills and Digestive Gland of the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **34**: 48–63.
- Rodrigues SR, Caldeira C, Castro BB, Gonçalves F, Nunes B, Antunes SC (2011). Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE

- characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **99**: 181–188.
- Roex EWM, Keijzers R, van Gestel CAM (2003). Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology* **64**: 451-460.
- Sanchez W e Porcher J-M (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *Trends in Analytical Chemistry* **28**: 150-158.
- Sarkar A, Nagarajan R, Chaphadkar S, Pal S, Singbal SYS (1997). Contamination of organochlorine pesticides in sediments from the arabian sea along the west coast of india. *Water Research* **31**: 195-200.
- Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S (2006). Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* **15**: 333-340.
- Sheehan D e Power A (1999). Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology* **123**: 193–199.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* **360**: 1-16.
- Silva A, Santos MB, Caneco B, Pestana G, Porteiro C, Carrera P, Stratoudakis Y (2006). Temporal and geographic variability of sardine maturity at length in the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science* **63**: 663-676.
- Sinovčić G, Keč VC, Zorica B (2008). Population structure, size at maturity and condition of sardine, *Sardina pilchardus* (Walb., 1792), in the nursery ground of the eastern Adriatic Sea (Krka River Estuary, Croatia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **76**: 739-744.
- Sol SY, Johnson LL, Boyd D, Olson OP, Lomax DP, Tracy K, Collier TK (2008). Relationships between anthropogenic chemical contaminant exposure and associated changes in reproductive parameters in male English Sole (*Parophrys vetulus*) collected from Hylebos Waterway, Puget Sound, Washington. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **55**: 627–638.
- Solé M, Antó M, Baena M, Carrasson M, Cartes JE, Maynou F (2010). 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. *Marine Environmental Research* **70**: 181-188.

- Solé M, Lobera G, Lima D, Reis-Henriques MA, Santos MM (2008). Esterases activities and lipid peroxidation levels in muscle tissue of the shanny *Lipophrys pholis* along several sites from the Portuguese Coast. *Marine Pollution Bulletin* **56**: 999–1007.
- Solé M, Porte C, Albaigés J (2001). Hydrocarbons, PCBs and DDT in the NW Mediterranean deep-sea *Mora moro*. *Deep-Sea Research I* **48**: 495-513.
- Somarakis S, Ganias K, Tserpes G, Koutsikopoulos C (2004). Ovarian allometry and the use of the gonosomatic index: a case study in the Mediterranean sardine, *Sardina pilchardus*. *Marine Biology* **146**: 181-189.
- Sousa AFCP (2008). Radioactividade em algumas espécies de pescado, da zona de captura do atlântico nordeste, consumidas em Portugal. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Stanic B, Andric N, Zoric S, Grubor-Lajsic G, Kovacevic R (2006). Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**: 395–402.
- Stratoudakis Y e Silva A (2001). A pescaria da sardinha, uma prioridade da investigação. Divulgação IPIMAR nº16, ISSN 0873-5506.
- Thébault MT (1984). Lactate content and lactate dehydrogenase activity in *Palaemon serratus* abdominal muscle during temperature changes. *Journal of Comparative Physiology B* **154**: 85-89.
- Timbrell JA (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology* **129**: 1-12.
- Tocher DR (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science* **11**(2): 107-184.
- Trujillo-Jiménez P, Sedeño-Díaz JE, Camargo JA, López-López E (2011). Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). *Ecological Indicators*, article in press.
- Tsangaris C, Kormas K, Stroglyoudi E, Hatzianestis I, Neofitou C, Andral B, Galgani F (2010). Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology* **151**: 369–378.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**: 57-149.
- Vassault A (1983). Lactate dehydrogenase. In *Methods of enzymatic analysis – Vol III (Enzymes: Oxireductases Transferases)*. Edited by H.O Bergmeyer. Academic Press, N.Y, pp 118-126.

- Vasseur P e Cossu-Leguille C (2006). Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere* **62**: 1033–1042.
- Vidal M-L, Bassères A, Narbonne J-F (2002). Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology* **131**: 133–151.
- Vidal-Liñán L, Bellas J, Campillo JA, Beiras R (2010). Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* **78**: 265–272.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2001). Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis, London, capítulo 1-2.
- Wang W e Ballatori N (1998). Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* **50**: 335-355.
- Whitehead PJP, Bauchot M-L, Hureau J-C, Nielsen J, Tortonese E (1989). Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. UNESCO, UK, Vol I: 276-277 pp.
- Won E-J, Kim R-O, Rhee J-S, Park GS, Lee J-H, Shin K-H, Lee Y-M, Lee J-S (2011). Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, article in press.
- Wu RSS e Lam PKS (1997). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and Lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (*Perna viridis*): possible biomarkers for hypoxia in the marine environment. *Water Research* **31**: 2797-2801.
- Yang TH, Lai NC, Graham JB, Somero GN (1992). Respiratory, Blood, and Heart Enzymatic Adaptations of *Sebastes alascanus* (Scorpaenidae; Teleostei) to the Oxygen Minimum Zone: A Comparative Study. *The Biological Bulletin* **183**: 490-499.
- Yang X (2004). Use of fish biomarkers to assess the contaminant exposure and effects in lake erie tributaries. Dissertação de Doutorado, Ohio State University, 150 pp.