

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES TECIDOS DO MOLUSCO *Helix aspersa* (MÜLLER, 1774)

SILVIA BONA¹, NÁDIA SCHRÖDER-PFEIFER²,
NORMA ANAIR POSSA MARRONI³, MARILENE PORAWSKI⁴

RESUMO

O presente trabalho objetiva avaliar a lipoperoxidação (LPO), atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em tecidos de animais expostos à poluição atmosférica da região metropolitana de POA. Utilizou-se o molusco *Helix aspersa* (n=36) divididos em: - grupo controle (C7 e C15), mantidos durante 7 ou 15 dias no laboratório de pesquisa na Ulbra; - grupo experimental (E7 e E15), mantidos durante 7 ou 15 dias em ambiente aberto na Estação de Climatologia da Ulbra. Após o período de exposição os animais foram crioadestesiados e retirados tecidos da glândula digestiva, pulmão e músculo do pé. Os tecidos foram homogeneizados para a quantificação de proteínas, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade da CAT e da SOD. Na glândula digestiva e no pulmão, animais E15 apresentam um aumento no dano oxidativo em relação ao C15 do mesmo período. Na glândula digestiva a CAT e a SOD aumentam sua atividade no grupo E15 em relação ao C15. No pulmão, a atividade da CAT é maior nos animais experimentais, enquanto que a atividade da SOD é maior nos animais controles. No músculo do pé ocorre um aumento significativo na LPO nos animais E7, que é acompanhado por um

¹ Acadêmica do Curso de Biologia – Bolsista PROICT/ULBRA

² Professora do Curso de Biologia/ULBRA

³ Professora do Curso de Fisioterapia/ULBRA

⁴ Professora – Orientadora do Curso de Fisioterapia/ULBRA
(marilene.pg@terra.com.br)

aumento significativo na atividade da SOD. Não houve diferença significativa na LPO e na atividade da CAT nos animais E15. Os dados sugerem que com 15 dias de exposição ao ambiente, a glândula digestiva e o pulmão respondem às alterações ambientais aumentando a lipoperoxidação e ativando suas defesas antioxidantes.

Palavras-chave: *Helix aspersa*, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, poluição.

ABSTRACT

More generally, work on invertebrate toxicology has been used to develop and refine protocols for the use of sentinel species in pollution monitoring. The range of biological factors governing pollutant assimilation and retention clearly determines the validity of using invertebrates to summarize pollution insults. Not the least of these are differences between populations, perhaps as the result of adaptation, induced by the selective pressures of a gross contamination. Our aims were to evaluate the effect of the environmental pollution on the oxidative stress and antioxidant defenses in *Helix aspersa* mollusk. Thirty-six animals were randomly selected and divided into four experimental groups with nine mollusk: two control groups with seven and fifteen days on laboratory and two exposition groups with seven and fifteen days on ULBRA climatology unity (metropolitan/pollution area). After the exposition period the animals were crio-anesthetized and lungs, digestive gland and foot muscle were excised and tissue from each mollusk was homogenised to assess lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity. Environmental pollution exposition after 15 days resulted in a significantly increase in the activities of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), catalase (CAT) enzyme and the superoxide dismutase (SOD) enzyme.

Key words: *Helix aspersa*, oxidative stress, antioxidant enzymes, pollution.

INTRODUÇÃO

Emissões de poluentes descartados via ar, terra e água, podem alterar o ambiente, contaminando os sistemas e a biota terrestre e aquática, podendo desencadear reações formadoras de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequentemente a formação de radicais livres de oxigênio, nos animais expostos à poluição (Livingstone, 1997).

Em organismos aeróbios, a produção normal de ERO é balanceada pela atividade das defesas

antioxidantes. Quando esse balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo encontra-se sob estresse oxidativo. Essa condição pode levar o organismo a desenvolver respostas adaptativas ou provocar danos como lipoperoxidação das membranas celulares, degradação de proteínas e lesão ao DNA (Salo et. al., 1991).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, presentes em concentrações relativamente baixas, inibem significativamente a taxa de oxidação sobre locais alvo. Como antioxidantes não

enzimáticos existem as vitaminas A e E, o ácido ascórbico, o ácido úrico, a glutathiona, a melatonina, certos flavonóides, entre outros. Dentre os antioxidantes enzimáticos responsáveis pela detoxificação das ERO podemos citar a catalase, a superóxido dismutase e a glutathiona peroxidase (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Organismos expostos a poluição, podem revelar indução ou inibição de suas defesas antioxidantes e variações nos componentes desse sistema podem ser utilizados como biomarcadores da pressão oxidativa mediada pelo contaminante (DiGiulio et al., 1989; Livingstone, 1994; Regoli, 2000).

Os moluscos são de grande importância ecológica, pois desempenham importante papel na cadeia trófica, explorando uma ampla faixa de recursos alimentares, podendo ser carnívoros, detritivos, herbívoros e filtradores. Alguns moluscos podem ser utilizados como indicadores das condições tróficas em ambientes aquáticos, como é o caso dos gastrópodes Ampullariidae, que efetuam a remoção de detritos e controlam populações de macrófitas aquáticas. Os bivalves, que se alimentam de plâncton e assimilam uma série de substâncias, também podem ser utilizados como indicadores de poluição (Veitenheimer-Mendes et al., 1986; Pereira et al., 2000). A capacidade de acumulação de metais por moluscos tem sido utilizada no monitoramento de ambientes contaminados por metais pesados (Shiber & Shatila, 1978; Zadory, 1984; Lakatos et al., 1990).

Há grande número de trabalhos utilizando moluscos, peixes, crustáceos e outros animais como indicadores de poluição, porém esses estudos concentram-se na avaliação da poluição aquática ou do solo e sedimentos. São escassos os trabalhos que utilizam animais, seja vertebrados ou invertebrados, como indicadores de

poluição atmosférica. O molusco *Helix aspersa* é um gastrópode terrestre, pulmonado, conhecido popularmente como escargot, sendo muito utilizado na alimentação e no monitoramento de ambientes contaminados por metais pesados.

O Banco Mundial (World Bank Report, 1998) através de seu relatório sobre as emissões atmosféricas no Brasil constatou que a região metropolitana de Porto Alegre ocupa a 5ª posição, no país, em quantidade de PM_{10} existente na atmosfera. A maior fonte de emissão de PM_{10} origina-se no escapamento dos veículos. Trabalhos recentes mostraram que uma das maiores fontes de emissão de PM_{10} em áreas urbanas originam-se de rodovias pavimentadas devido, primariamente à ressuspensão do material depositado nas rodovias asfaltadas (Chan et al., 2001; Kuhler et al., 1988; Marcazzan, 2001; Pfeffer, 1994; Roorda-Knape et al., 1998; Venkatran, 2000).

O presente trabalho tem como objetivo, avaliar o efeito da poluição atmosférica, sobre a glândula digestiva, pulmão e músculo do pé em *Helix aspersa*.

MATERIAL E MÉTODOS

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A área de estudo foi a Região Metropolitana de Porto Alegre, que se encontra atravessada pela rodovia BR 116. O trabalho foi realizado no mês de outubro de 2003, na primavera.

Foram utilizados 36 moluscos *Helix aspersa*, provenientes de heliciário comercial de São Paulo. Permaneceram uma semana no laboratório de Pesquisa de Poluição Ambiental da ULBRA, para adaptação ao novo ambiente. Após, este período os animais foram divididos em: grupo controle C7 (n=7) e C15 (n=7) mantidos durante 7 ou 15 dias no laboratório de pesquisa; e grupo experimental E7 (n=10) e E15 (n=12) mantidos durante 7 ou 15 dias em ambiente aberto na Estação de Climatologia da ULBRA. Os moluscos foram acondicionados em caixas plásticas, com tampa de tela de malha fina (0,18 mm), o fundo da caixa foi coberto por uma camada de terra preta de jardim esterilizada e umedecida a cada dois dias. Os animais foram alimentados com uma ração modificada por Mansur & Machado (1994), na medida de 0,1 grama para cada animal, oferecida a cada dois dias.

Processamento dos tecidos

Após cada período (7 ou 15 dias), os animais foram crioadestesiados para retirada da glândula digestiva, pulmão e músculo do pé, os quais foram identificados e congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos foram mantidos a -70°C , para posteriores análises. Para as análises bioquímicas, os tecidos foram pesados e colocados em solução de tampão fosfato 20mM (KCl 140mM) na proporção de 9 ml por grama de tecido. Em homogeneizador ULTRA-TURRAX (IKA-WERK), os tecidos foram homogeneizados durante 80 segundos, à temperatura de $0-2^{\circ}\text{C}$. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada (SORVALL® RC-5B Refrigerated

Superspeed Centrifuge), durante 10 minutos a 4000 rpm (Llesuy et. al., 1985). Retirou-se o sobrenadante que foi utilizado para dosagem de proteína, determinação da lipoperoxidação e atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase.

Quantificação de Proteínas

A proteína dos tecidos homogeneizados foi quantificada, segundo o método de Lowry et. al., (1951). Como padrão utilizou-se albumina bovina (SIGMA) e a leitura foi realizada a 625nm em espectrofotômetro (UV Vis Spectrophotometer METROLAB 1700).

Avaliação da Lipoperoxidação (LPO):

Método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A técnica de TBARS, foi realizada conforme o método de Buege & Aust, (1978). Utilizou-se solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%, o homogeneizado obtido de cada tecido do molusco, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e água destilada. Essa mistura foi aquecida a 100°C , em banho-maria, durante 15 minutos e resfriada em gelo por aproximadamente 10 minutos. Após, acrescentou-se álcool n-butílico, agitando por 40 segundos em VORTEX, e centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. Assim obteve-se um sobrenadante corado, resultante da reação de malonaldeído e outros subprodutos liberados na LPO. O sobrenadante foi retirado e

colocado em cubeta de vidro para leitura a 535 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nanomoles por miligrama de proteína (nmoles/mg prot.).

Atividade das enzimas antioxidantes:

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima antioxidante SOD, foi avaliada segundo a técnica descrita por Myrta e Fridovich (1983) para determinação em espectrofotômetro da capacidade da SOD em inibir a reação do radical superóxido com adrenalina. Na cubeta de quartzo, coloca-se tampão glicina 50mM com pH 11, uma alíquota de homogeneizado e adrenalina. Após agitação é realizada leitura a 480 nm em espectrofotômetro. Os dados são expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (u SOD/ mg prot.).

CATALASE (CAT)

A atividade da enzima catalase foi avaliada, conforme descrito por Boveris & Chance (1973), através da determinação em espectrofotômetro da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio 0,3 M, adicionado a amostra. Sendo a decomposição do peróxido de hidrogênio di-

retamente proporcional à atividade da CAT. São colocados em cubeta de quartzo o tampão fosfato 50mM com pH 7, o homogeneizado e o peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240nm e os dados expressos em pico moles por miligrama de proteína (pmoles/mg prot.).

Análise estatística

A análise estatística utilizada para a comparação entre os grupos foi o teste "t" de Student (GraphPad InStat). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média para cada grupo de n valores.

RESULTADOS

No tecido da glândula digestiva, a lipoperoxidação medida nos animais experimentais e controle foi maior aos 7 dias. Aos 15 dias, a LPO diminuiu, em ambos grupos, porém os animais experimentais apresentaram aumento significativo no dano oxidativo medido pela LPO quando comparados ao seu controle. A CAT apresentou maior atividade no grupo C7. Enquanto que a SOD foi significativamente maior no grupo E15 (Figura 1).

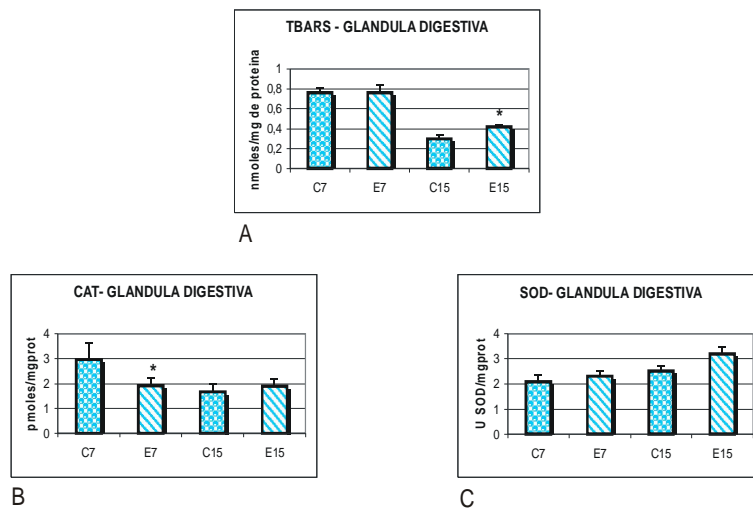


Figura 1 - Determinação dos níveis de lipoperoxidação, pelo método de TBARS, **(A)**. Atividade da enzima catalase **(B)** e atividade da SOD **(C)** na glândula digestiva. **(*)** diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle do mesmo período, onde $p < 0,05$.

No pulmão, assim como na glândula digestiva, a LPO foi maior nos grupos C7 e E7 quando comparados com os grupos C15 e E15. Porém, no grupo E15 o dano oxidativo foi significativamente maior quando comparado ao grupo C15.

A catalase apresentou maior atividade nos grupos E7 e E15 quando comparados aos seus controles. A superóxido dismutase foi significativamente maior nos animais do grupo controle C7 (Figura 2).

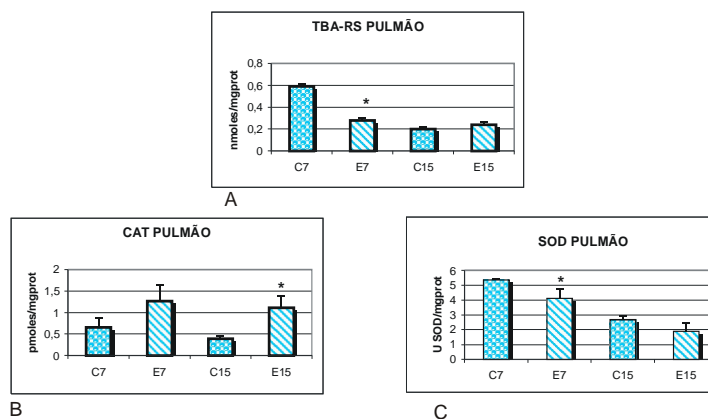


Figura 2 - Determinação dos níveis de lipoperoxidação, pelo método de TBARS **(A)** atividade da enzima catalase **(B)** e atividade da SOD **(C)**, no pulmão. **(*)** diferença significativa do grupo exposto em relação ao controle do mesmo período, onde $p < 0,05$.

No músculo do pé, o grupo E7 apresentou níveis de LPO significativamente maiores em relação aos demais grupos, o que foi acompanhado, também, por aumento significativo

na atividade da SOD neste grupo, assim como no grupo E15. A CAT não apresentou variações significativas nos diferentes grupos (Figura 3).

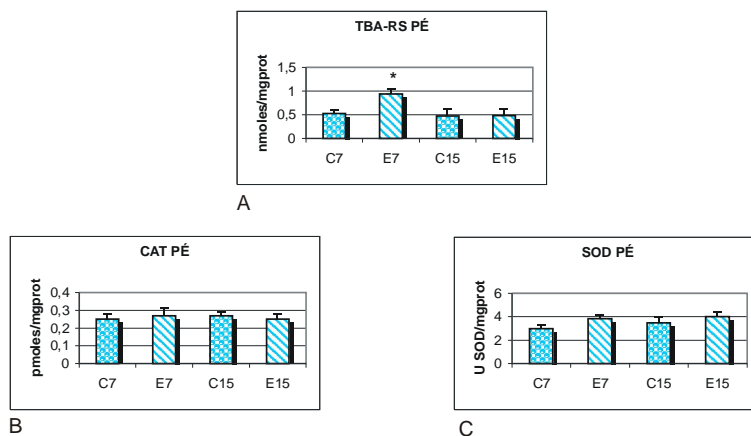


Figura 3 - Determinação dos níveis de lipoperoxidação, pelo método de TBARS (A) atividade da enzima catalase (B) e atividade da SOD (C), no músculo do pé. (*) diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle do mesmo período, onde $p < 0,05$.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A avaliação da qualidade ambiental é realizada através das análises físico-químicas e biológicas no ambiente. O monitoramento ativo com bioindicadores deve ser utilizado como complementação das análises físico-químicas, utilizando como critério biológico o grau de sobrevivência do organismo exposto, sua vitalidade e alterações fisiológicas subletais. (Schäfer, 1985).

Os moluscos mantidos durante 15 dias expostos ao ambiente da região metropolitana de Porto Alegre apresentaram, na glândula digestiva e no pulmão, aumento no dano oxidativo das membranas quando comparados aos seus controles. Ao

mesmo tempo houve aumento na atividade da enzima superóxido dismutase na glândula digestiva e aumento na atividade da catalase no pulmão dos animais expostos ao ambiente. Esse aumento na atividade das enzimas antioxidantes pode estar atuando como mecanismo de proteção à um dano maior no tecido.

Estudos com glândula digestiva de *Ostra (Saccostrea cucullata, Born, 1778)* demonstraram um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e Glutathione peroxidase em populações que vivem em ambientes poluídos quando comparadas a populações de ambientes não poluídos (Niogy et. al., 2001).

Mariscos (*Chamelea gallina (Linnaeus, 1758)*) retirados de ambientes poluídos apresentaram

aumento na atividade enzimática e baixos níveis de malondealdeído, o que sugere que animais expostos cronicamente à poluição estão melhor protegidos contra o estresse oxidativo que animais das regiões de referência (Rodrigues-Ortega et. al., 2002).

Estudos com *Helix aspersa* coletados de um local poluído e outro grupo de local não poluído aos quais adicionou-se chumbo (Pb) na alimentação, mostrou que animais do ambiente não poluído armazenaram mais Pb que animais do local poluído. Provavelmente, os animais de uma área considerada poluída podem estar condicionados a eliminar mais rapidamente os xenobioticos. (Beeby & Richmond, 1987).

O tecido do músculo do pé, apresentou aumento significativo na LPO no grupo E7 em relação aos demais grupos. Este aumento da LPO foi acompanhado por um aumento significativo na atividade da SOD em relação ao controle que se manteve no período de 15 dias de exposição. A catalase não apresentou variação expressiva nos grupos durante o período de estudo.

Com os resultados obtidos neste estudo, podemos sugerir que com 15 dias de exposição ao ambiente, a glândula digestiva e o pulmão respondem às modificações ambientais, ativando suas defesas antioxidantes. Em relação ao músculo do pé, talvez seja necessário um tempo maior de exposição para evidenciar respostas adaptativas ao ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

BEEBY, A.; RICHMOND, L. Adaptation by na urban population of the snail *Helix aspersa* to a diet contaminated with lead. **Environmental Pollution** v.46, p.73-82, 1987.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v.134, p.707-716, 1973.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v.52, p.302-309, 1978.

CHAN, L. Y.; KWOK, W. S. Roadside suspended particulate at heavily trafficked urban sites of Hong Kong - Seasonal variation and dependence on meteorological conditions. **Atmospheric Environmental** , v.35, p.3177-3182, 2001.

DIGIULIO, R. T. et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinats of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.8, p.1103-1123, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press Inc., 1999.

KUHLER, M. et al. Dispersion of car emissions in the vicinity of a highway. **Environmental Meteorology**, Dordrecht, p.39-47, 1988.

LAKATOS, Gy. et al. Use of freshwater mussels to biomonitor the metal loading of river Sajo in Hungry. GSF-Bericht 1/92: **Proceedings of an International Symposium on Ecotoxicology**, Munich, [n.p.], nov.1990.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic

- xenobiotics in aquatic ecosystems: a quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.120A, p.43-49, 1997.
- LIVINGSTONE, D. R. Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v.1, p.88-94, 1994.
- LLESUY, S. F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epidrimicin in mice. **Tumor**, v. 71, p.241-249, 1985.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the foline reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MARCAZZAN, G. M. et al. Characterization of PM₁₀ and PM_{2,5} particulate matter in the ambient air of Milan (Italy). **Atmospheric Environment**, v.35, p.4639-4650, 2001.
- NIYOGI, S. et al. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarker of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. **Science of the Total Environment**, v.281, n.1/3, p.237-246, 2001.
- PEREIRA, D. et al. Malacofauna límnic do sistema de irrigação da microbacia do Arroio Capivara, Triunfo, RS, Brasil. **Biociências**, Porto Alegre, v.8, n.1, p.137-157, 2000.
- PFEFFER, H. U. Ambient air concentrations of pollutants at traffic-related sites in urban areas of North-Rhine-Westphalia, Germany. **Science of the Total Environment**, v.146/147, p.263-273, 1994.
- REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v.50, p.351-361, 2000.
- RODRIGUES-ORTEGA, M. J. et al. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from south-Spanish littoral. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.21, n.3, p.542-549, 2002.
- ROORDA-KNAPE, M. et al. Air pollution from traffic in City Districts near major motorways. **Atmospheric Environment**, v.32, p.1921-1930, 1998.
- SALO, D.C.; DONOVAN, C.M.; DAVIES, K.J.A. HSP 70 and other possible heat shock proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver during exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p.239-246, 1991.
- SCHÄFER, A. Critérios e Métodos para avaliação das águas superficiais – Análise da diversidade de Biocenoses. **NIDECO, Serie Taim**, Porto Alegre, n.3, p.5-44, 1985.
- SHIBER, J.G.; SHATILA, T.A. Lead, cadmium, copper, nickel and iron in limpets, mussels and snails from the coast of Ras Beirut, Lebanon. **Marine Environmental Research**, n.1, p.125-134, 1978.
- VENKATRAM, A. A. Critique of empirical emission factor models: a case study of the AP-42 model for estimating PM₁₀ emissions from paved road. **Atmospheric Environment**, v.34, p.1-11, 2000.
- VEITENHEIMER-MENDES, I. L.; LOPES-PITONI, V. L.; SILVA, M. C. P. da; SCHRÖDER, N. T. Levantamento da malacofauna límnic na área de influencia da termoeletrica Jacuí I – RS, em julho de 1986. Porto Alegre, 1986. [n.p.].

to datilografado.

WORLD BANK. Brazil, Managing Pollution Problems. **Report N° 16635**, February 27, 1998.

ZADORY, L. Freshwater mollusks as accumulation. **Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie**, Berlin, v.317, p.375-379, 1984.