

DETERMINAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO E ATIVIDADE DA CATALASE EM FÍGADO E BRÂNQUIAS DE PEIXES COLETADOS NO ARROIO SAPUCAIA, BACIA DO GUAÍBA, RS

SOLANGE MARIA DOVAL FONSECA¹, MARIA INÉS RODRIGUES²,
NORMA P. MARRONI³, MARILENE PORAWSKI⁴

RESUMO

*O trabalho propõem-se a estudar os efeitos da poluição do Arroio Sapucaia sobre o estresse oxidativo em diferentes tecidos de peixes coletados no arroio. Peixes da espécie *Cyphocharax saladensis* (birus) foram coletados em dois pontos do Arroio Sapucaia: (a) ponto 1: interior do município de Santa Tecla – baixos índices de poluição; (b) ponto 2: desembocadura do rio dos Sinos – altos índices de poluição agrícola e industrial. Foram retirados fígado e brânquias desses animais. Os tecidos foram pesados, homogeneizados e centrifugados para a quantificação de proteínas, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e atividade da enzima antioxidante catalase (CAT). Os peixes coletados no ponto 1 apresentaram maior lipoperoxidação (LP) no fígado e menor LP nas brânquias quando comparados aos animais coletados no ponto 2, nas diferentes estações do ano. Foi observada uma relação inversa entre a LP e a atividade da CAT no fígado e nas brânquias desses animais. Os resultados sugerem um aumento das defesas antioxidantes nos animais que vivem em ambientes poluídos, porém esta resposta parece ser específica para cada tecido.*

¹Acadêmica do Curso de Biologia – Bolsista PROICT/ULBRA

³Professora do Curso de Fisioterapia/ULBRA

²Bióloga e técnica de laboratório - UFRGS

⁴Professora - orientadora do Curso de Fisioterapia/ULBRA

ABSTRACT

The paper's purpose was study the pollution effects on oxidative stress in fishes of the Sapucaia stream. Fishes (Cyphocharax saladensis) were collected at two sites of Sapucaia stream: (a) site 1: in Santa Tecla city - low environmental impact; (b) site 2: in its final course in the vicinities of the Sinos river – high environmental impact. Liver and gills were weighed, homogenized and centrifuged and the supernatants were used for the determination of proteins contents, thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) and catalase (CAT) activity. The fishes collected at site 1 presents higher lipidic peroxidation (LP) in liver and lower LP in gills that specimens collected at site 2, in different seasons. An inverse correlation between LP and CAT activity was detected in liver and gills. The results suggest an increased in antioxidants defenses in the animals that live at site pollution, however this response was tissue-specific.

INTRODUÇÃO

O Arroio Sapucaia localiza-se na região metropolitana de Porto Alegre, é um afluente do Rio dos Sinos e ao longo de seu curso, com aproximadamente 25 km de extensão, são encontradas áreas de grande atividade agrícola, como lavouras de arroz características dessa região nas quais são empregados pesticidas; regiões com alta densidade populacional com descarga de esgoto e depósitos de lixo urbano; o curso do arroio atravessa estradas como a BR116 e a RS118 onde existe intenso tráfego de veículos, e indústrias químicas coureiro-calçadista, refinarias de petróleo, de artefatos de cimento e metal. A presença dos componentes oriundos deste tipo de poluição participam das reações formadoras de espécies reativas de oxigênio (ERO) e conseqüente formação de radicais livres (RL) nos organismos.

Em organismos aeróbios, a produção das ERO é balanceada com os sistemas de defesa antioxidante. Contudo, um distúrbio no balanço entre pró-oxidantes/antioxidantes em favor dos primeiros, leva a um dano potencial, gerando uma situação de estresse oxidativo, que pode promover respostas adaptativas ou lesão celular.

Em alguns casos, o estresse oxidativo moderado pode regular positivamente as defesas, de modo a proteger as células de danos subseqüentes mais severos (Salo et. al,1991).

Muitas classes de poluentes ambientais são conhecidos como substâncias que aumentam a formação intracelular de ERO (Maestro,1980; Winston & DiGiulio,1991). Organismos expostos a ecossistemas poluídos podem revelar indução ou inibição de suas defesas antioxidantes. Variações nos componentes desse sistema de defesa antioxidante e presença de danos aos tecidos têm sido propostos como biomarcadores de poluição em organismos como moluscos e peixes (DiGiulio et. al, 1989; Livingstone et. al, 1990).

Quando as ERO são produzidas além do que suas defesas antioxidantes podem proteger, surgem diferentes formas de toxicidade como a lipoperoxidação das membranas celulares, degradação de proteínas e dano ao DNA (Regoli, 2000). Agrawal e colaboradores (1991), sugerem que a LP poderia ser a principal causa molecular de injúria do tecido.

Variáveis como, idade, variações sazonais de temperatura da água e disponibilidade de oxigê-

nio, período reprodutivo, comportamento e a presença de poluentes na água, alteram o metabolismo e conseqüentemente a formação de RL com alterações nos níveis de LP e atividades de enzimas antioxidantes (Livingstone et al., 1990; Viarengo et al., 1991; Power & Sheeham, 1996; Regoli, 2000; Vidal et al., 2002). Semelhantes a outros vertebrados os teleósteos possuem um sistema de defesa antioxidante que utilizam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Entre as enzimas que fazem parte desse mecanismo estão a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). O sistema de defesa não enzimático utiliza em seu mecanismo a glutathione, vitaminas E, C, A e caroteno, entre outras (Wilhelm Filho, 1996).

Os peixes são um importante modelo em toxicologia ambiental para determinação de efeitos letais e sub-letais de poluentes presentes em ecossistemas aquáticos. Bagres (*Channa punctatus* Bloch) expostos a 1% de efluente de uma fábrica de papel por períodos curtos ou de longa duração, apresentaram LP nos tecidos analisados, assim como indução ou supressão órgão-específica de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Em geral, a indução foi observada no fígado e supressão em outros órgãos como brânquias e rins. A resposta antioxidante foi tempo-dependente, exceto para CAT que mostrou supressão inicial no fígado sob os períodos mais curtos de exposição (15 e 30 dias) seguido de indução durante exposição sub-crônica e crônica (60 e 90 dias) (Ahmad et. al, 2000).

O objetivo do trabalho foi avaliar a lipoperoxidação e a atividade da enzima catalase em fígado e brânquias de peixes coletados no Arroio Sapucaia, Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento das Coletas

Foram realizadas coletas mensais de Maio de 2001 a Maio de 2002 em dois locais: (a) ponto 1 que localiza-se dentro de uma fazenda particular no município de Santa Tecla. A região apresenta baixa densidade populacional e a atividade agrícola predominante é agricultura de subsistência. (b) ponto 2 localiza-se no final do curso do Arroio Sapucaia, junto à desembocadura do Rio dos Sinos, após ter passado por lavouras de arroz, indústrias químicas e refinarias, estradas com tráfego intenso e cidades com alta densidade populacional e, portanto geradoras de esgoto urbano.

Os peixes, todos de espécie *Cyphocharax saladensis* popularmente conhecida como birú, foram coletados com o auxílio de tarrafas no ponto 1, e no ponto 2 foram utilizadas redes de espera malha 3.0 colocadas com auxílio de barco à motor.

Os birús foram imediatamente decapitados para a retirada de fígado e brânquias, os quais foram embalados em papel alumínio, numerados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em gelo seco durante o transporte até o laboratório. Os peixes foram coletados nas estações de primavera, verão, outono e inverno nos dois pontos de coleta.

Processamento dos tecidos

No laboratório, os tecidos foram pesados em balança de precisão (ACCULAB® V-Img)

homogeneizados em tampão fosfato 20mM (KCl 140 mM) na proporção de 9ml por grama de tecido em temperatura de 0 a 2°C por um minuto com homogeneizador Ultra Turrax (IKA-WERK).

O homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (SORVALL®RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge - 4°C) por 10 minutos a 3000 rpm (Llesuy et al., 1985). Desprezou-se o precipitado, o sobrenadante foi armazenado em eppendorf e mantido a -70°C para ser utilizado nas técnicas para determinar proteínas, lipoperoxidação e atividade da catalase.

Quantificação de proteínas

O método de Lowry et al, 1951 foi utilizado para a quantificação de proteína em brânquias e fígado dos peixes, utilizando albumina bovina (SIGMA) a 1mg/ml como padrão. No homogeneizado obtido das amostras adicionado H₂O destilada, reativo C (NaHCO₃, CuSO₄.H₂O 1%, tartarato de sódio e potássio 2%) e Folin-Ciocalteu (1:3) com leitura em espectrofotômetro a 265 nm.

Avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A lipoperoxidação foi avaliada a partir das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, segundo o método descrito por Buege & Aust, 1978, utilizando solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. No homogeneizado obtido conforme descrito no item 2.2, foi acrescentado ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e água destilada. Essa mistura foi aquecida a 100°C durante 15 minutos e resfriada em gelo. Após,

adicionou-se álcool n-butílico agitando por 40 segundos, esse material foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, obtendo-se dessa forma um produto corado, resultante da reação de malondialdeído e outros subprodutos liberados na lipoperoxidação. Este produto foi colocado em cubeta de vidro para leitura a 535 nm em espectrofotômetro (Uv Vis Spectrophotometer METROLAB 1700). Resultados expressos em nanomoles por miligrama de proteína (nmoles/mg prot).

Atividade da enzima Catalase

A atividade da enzima antioxidante catalase foi avaliada, segundo técnica descrita por Boveris & Chance, 1973, pela determinação, em espectrofotômetro, da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,3M) adicionado à amostra. A decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática. São colocados em cubeta de quartzo o tampão fosfato 50 mM – pH 7,0, uma alíquota do homogeneizado e o peróxido de hidrogênio e foi realizada leitura em espectrofotômetro a 240nm. Os dados foram expressos em pico moles por miligrama de proteína (pmoles/mg prot).

Análise estatística

Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo de n valores (as amostras variam de 6 a 10 valores).

A comparação entre os grupos foi realizada através do teste "t" de Student (GraphPad InStat software, versão 3.0 para Windows 95 – GraphPad

Software, San Diego, Califórnia), com $p < 0,05$.

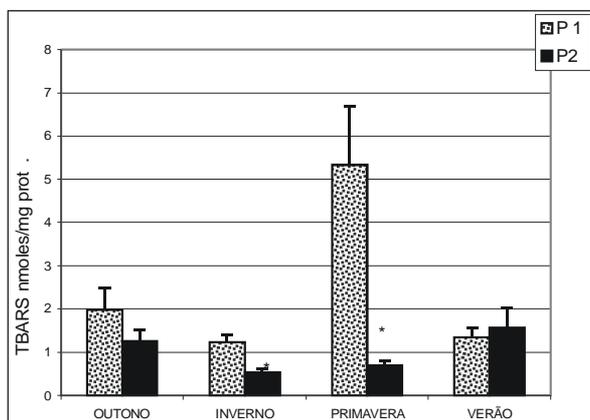
RESULTADOS

Os animais coletados no ponto 2 apresentaram menor LP no fígado quando comparados aos animais do ponto 1 em todas as estações do ano com exceção do verão. Inversamente, os animais coletados no ponto 2 apresentaram maior LP nas

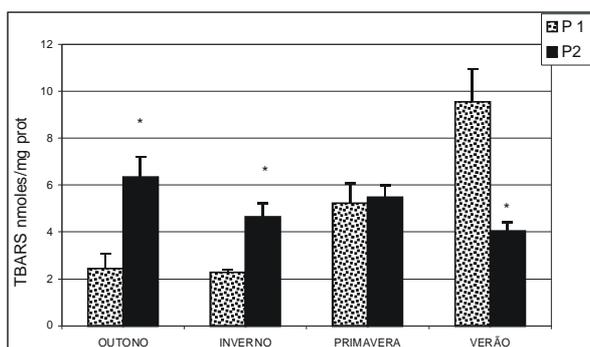
brânquias do que os animais do ponto 1 em todas as estações do ano com exceção do verão. (Fig. 1)

A atividade da CAT no fígado foi maior no ponto 2 no outono e na primavera, sem diferença significativa entre estas estações. A atividade da CAT nas brânquias foi maior no ponto 2 em relação aos animais do ponto 1 em todas as estações do ano com exceção da primavera. (Fig. 2)

Existe uma correlação inversa entre a LP medida e a atividade da CAT no fígado e nas brânquias.

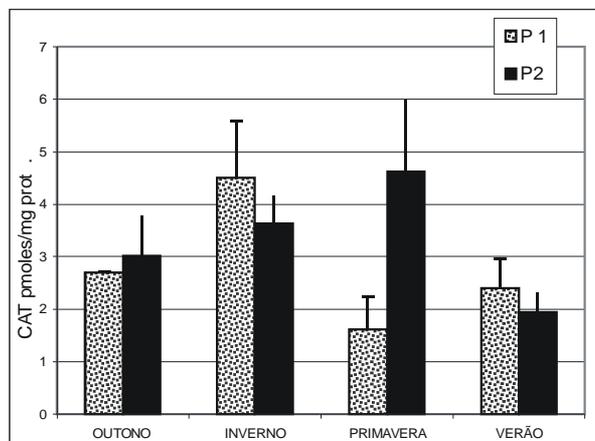


A

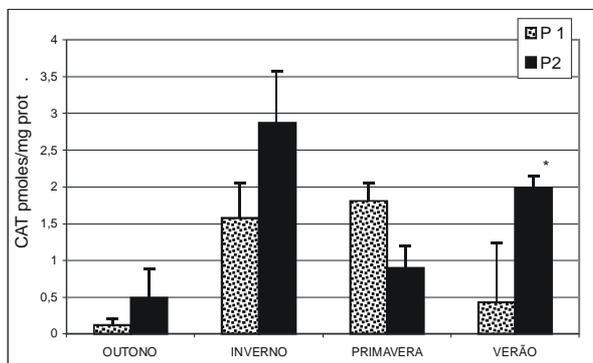


B

Figura 1 – Lipoperoxidação em fígado (A) e brânquias (B). Valores em médias \pm EP. * Diferenças significativas $p < 0,01$ entre os pontos 1 e 2.



A



B

Figura 2 – Atividade da CAT em fígado (A) e brânquias (B). Valores em médias \pm EP. * Diferenças significativas $p < 0,01$ entre os pontos 1 e 2.

DISCUSSÃO

Atualmente existe grande interesse em correlacionar o aumento na produção de ERO estimulado por contaminantes, resultando em dano oxidativo uma vez que este pode ser um mecanismo de toxicidade em organismos aquáticos expostos à poluição (DiGiulio et. al, 1989; Winston & DiGiulio, 1991; Lemaire & Livingstone, 1993; Livingstone, 2001).

Os animais coletados no ponto 2 apresentaram menor LP no fígado e aumento de LP nas brânquias quando comparados com os animais coletados no ponto 1. A diminuição da LP no fígado dos animais do ponto 2 pode estar relacionada com o aumento na atividade da CAT, enquanto nas brânquias, a atividade da CAT está diminuída no ponto 2 onde observa-se aumento na LP.

Estudos com a glândula digestiva de Oyster (*Saccostrea cucullata*) demonstram um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e Glutathione peroxidase em populações que vivem em ambientes poluídos quando comparados a populações de região não poluída nas diferentes estações do ano (Niogy et. al, 2001).

Em tilápias expostas à diferentes concentrações de cádmio in vivo mostraram aumento na atividade da SOD e GPx inibindo assim, a formação de lipoperóxidos (Almeida et. al, 2002).

Mariscos (*Chamaelea gallina*) retirados de ambientes poluídos também mostraram um aumento na atividade das enzimas antioxidantes e baixos níveis de malondialdeído, o que sugere que animais expostos cronicamente à poluição estão melhor protegidos do estresse oxidativo do que os animais das regiões de referência (Rodrigues-Ortega et. al, 2002).

Bioacumulação de xenobióticos e resposta de biomarcadores podem ser modulados pelo nível de O₂ dissolvido (Panuzzio & Storey, 1998).

Nas estações mais frias (outono e inverno), há um aumento nas concentrações de poluentes na água, próprio da diminuição na taxa de evaporação e da maior quantidade de chuvas, o que aumenta os poluente trazidos por lixiviação. Por outro lado, nas estações mais quentes (primavera e verão), o metabolismo desses animais aumenta o que leva a uma maior atividade enzimática. Os peixes coletados no ponto 2 parecem apresentar uma melhor condição de resposta a um ambiente com níveis elevados de poluição. Os animais coletados em ambiente poluído apresentaram um aumento na atividade da CAT, diminuindo o dano nas membranas celulares. Os peixes do ponto 1, normalmente menos expostos à poluição, apresen-

tam maior dificuldade em ativar suas defesas antioxidantes frente a mudanças ambientais e aumento nos níveis de poluição. A resposta das enzimas antioxidantes foi tecido-específica, pois nas brânquias dos animais do ponto 2, não ocorreu a mesma capacidade em aumentar a atividade da CAT e conseqüentemente o nível de LP foi maior.

Os resultados parecem indicar que os animais que vivem em ambientes poluídos apresentam respostas adaptativas para reduzir os efeitos do estresse oxidativo através do aumento das defesas antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, D.; SULTANA, P.; GOUPTA, G. S. D. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorohexane. **Food and Chemical Toxicology**, v.29, p.459-462, 1991.

AHMAD, I.; HAMID, T; FATIMA, M.; CHAND, H. S.; JAIN, S.K.; ATHAT, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in feshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomaker paper mill effluent exposure. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1519, p.37-48, 2000.

ALMEIDA, J. A.; DINIZ, Y. S.; MARQUES, S. F.; FAINE, L. A.; RIBAS, B. O.; BURNEIKO, R. C.; NOVELLI, E. L. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environmental International**, v.27, n.8, p.673-9, 2002.

- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **The 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.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v.59, p. 527-605, 1979.
- DIGIULLIO, R.T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J.; WINSTON, G.W.; JEWELL, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.8, p.1103-1123, 1989.
- GUTTERIDGE, J. M. C. Tissue damage by oxi-radicals: the possible involvement of iron and cooper complexes. **Medical Biology**, v.62, p.101-104, 1984.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; QUILAN, G. J. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidizing proteins. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1156, p.144-150, 1993.
- HIDALGO, C. M.; EXPÓSITO, A.; PALMA, J. M.; HIGUERA, M. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v.34, p.183-193, 2002.
- LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D. R. Pro-oxidant/antioxidant process and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and mussel *Mytilus edulis*. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology**, v.1, p.1119-1150, 1993.
- LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, n.8, p.656-666, 2001.
- LIVINGSTONE, D.R.; GARCIA-MARTINEZ, P.; MICHEL, X.; NARBONNE, J.F.; O'HARA, S.; RIBERA, D.; WINSTON, G.W. Oxiradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. **Functional Ecology**, v.4, p.415-424, 1990.
- LLESUY, M.J.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A. ; MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epidramycin in mice **Tumori**, v.71, p.241-249, 1985.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, A. J. Protein measurement with the pholin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MAESTRO, R. F. Uma abordagem aos Radicais Livres em Medicina e Biologia. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.492, p.153-168, 1980.
- NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A. G. 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.

PANNUNZIO, T. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littore*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.221, p.277-292, 1998.

POWER, A.; SHEEHAN, D. Seasonal variation in the antioxidant defense systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.114C, p.99-103, 1996.

REGOLI, E. Trace metal and antioxidant enzymes in gills and digestive glands of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.34, p.48-63, 1998.

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.

RODRIGUEZ-ORTEGA, M. J.; ALHAMA, J.; FUNES, V.; ROMERO-RUIZ, A.; RODRIGUEZ-ARIZA, A.; LOPEZ-BAREA, J. 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.

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.

VIARENGO, A.; CANESI, L.; PUTICA, M.; LIVINGSTONE, D. R.; ORENESU, M. Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of antioxidant defense systems. **Experientia**, v.47, p.454-457, 1991.

VIDAL, M. L.; BASSERES, A.; NARBONNE, J. F. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.132 C, p.93-104, 2002.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – A comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1735-1742, 1996.

WINSTON, G. W.; DIGIULIO, R. T. Pro-oxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v.19, p.137-161, 1991.