



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**INVESTIGAÇÃO BIOQUÍMICA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
CRASSOSTREA GIGAS EXPOSTAS A 1-CLORO-2,4-DINITROBENZENO: O
PAPEL DA GLUTATIONA NA RESPOSTA A AGENTES ELETROFÍLICOS**

Gabriel Delapedra

Florianópolis, SC
Novembro de 2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**INVESTIGAÇÃO BIOQUÍMICA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
CRASSOSTREA GIGAS EXPOSTAS A 1-CLORO-2,4-DINITROBENZENO: O
PAPEL DA GLUTATIONA NA RESPOSTA A AGENTES ELETROFÍLICOS**

Gabriel Delapedra

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial
para a obtenção do grau de Licenciado
em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Rafael Trevisan

Pós-doutorando do Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura e Recursos
Pesqueiros, Centro de Ciências Agrárias
– UFSC

Coorientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

Departamento de Bioquímica, Centro de
Ciências Biológicas – UFSC

Florianópolis, SC
Novembro de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a toda minha família, em especial aos meus pais, Jorge e Maria Clara, minha madrinha, Marta e meu irmão Caio por todo esforço e apoio para que eu sempre tivesse tudo do melhor possível e as melhores condições para estudar. Saibam que se cheguei até aqui e até onde poderei chegar só foi e será possível graças a vocês.

Também agradeço aos amigos de escola, “TERCEIRÃO 2008”, Vitor, Pedro, Edward, Karen, Jow, Fran, Fernando, Bruno, Agda, Tchu, Jéssica, Nayet, Danilo, Lucas, Letícia, Gordo, Demétrio, Thaís e tantos outros não mencionados, mas não menos importantes, pelo companheirismo, risadas, zoeiras e amizade desde sempre, além dos churrascos épicos “CTFD”. Os anos de ensino fundamental e médio com vocês foram muito valiosos e guardo com carinho especial cada um de vocês, assim como torço por cada um para que alcancem e conquistem tudo aquilo que desejam em suas vidas.

Aos amigos Zelão, Welder, Fernandinho, Leonam, Valério, Celo, Rafael e aqui reforço novamente Vitor e Pedro, pelas risadas, zoeiras, jogos de futebol, basquete, noites de poker, videogames, filmes, cervejas, vodkas, whiskys, churrascos, prosas, “filosofadas” e afins, sou muito grato a todos pela amizade de vocês pelos ensinamentos e aprendizagens que tive com vocês e assim como foram maravilhosos os tempos que passamos juntos, serão os que ainda passaremos, afinal a vida nos proporciona vários novos irmãos.

Ao pessoal da época do cursinho Poliedro, Zeh, Murilo Bambini, Murilo, Flávio, Felipe, Renan, Wilson (Wiiiiiiiilson), Matheus, Matheus Veras, Arthur, Luciano, Henrique, André (Andrééééé), Thiago e outros também não mencionados, mas sem dúvidas muito importantes, agradeço a vocês pela amizade, as risadas, zoeiras no “ASTOR” hotel, as idas no “PUB” e claro na “PADOCA” e no alojamento, o esforço e estudo tenho certeza que fizeram toda a diferença no futuro de cada um de nós e aquele meio ano no cursinho, assim como a amizade de cada um de vocês me fez crescer muito como pessoa e também na minha futura carreira profissional.

Os amigos da faculdade, Rafael, Saulo, Antônio, Bruna, Dionia, Joana, Eduardo, Bidu, Panda, Lai, alguns destes com os quais convivi do início ao final da graduação, outros conheci no caminho e/ou trabalhando junto, já aproveito assim para deixar aqui o agradecimento ao pessoal da Pacha (80% de estudantes da Bio) com quem trabalhei durante mais de 2 anos, fica o meu agradecimento a cada um de vocês, seja na faculdade ou nos “extras”, a companhia, convivência e amizade de todos vocês, sem dúvida, me fizeram ver a vida de novas maneiras, rever e aprender novos conceitos e com eles tentar sempre me tornar uma pessoa melhor.

Muito importante deixar meu agradecimento aqui aos amigos do Salvamento Aquático, no qual através do trabalho como Guarda-vidas pude fazer várias novas amizades, companheiros de trabalho e para a vida toda, em um trabalho no qual temos o prazer de poder ajudar ao próximo através do nosso esforço e dedicação, zelando pela segurança das pessoas, para que através de nosso trabalho possam se divertir nas praias com sua família com tranquilidade. Então deixo aqui meu muito obrigado ao meu irmão Caio, Ivan, Diego, Tiago, Pacheco, Rafael, Félix, Gil, Constantino, Henrique, Patrick, Pyetro, Lucho, Paula, Marcos, Vinícius, SD de Sousa, SD Mertins e tantos outros aqui não mencionados, mas de igual importância.

Aos professores que fizeram parte da minha vida, desde o pré até o curso de Ciências Biológicas, muito obrigado por tudo que vocês fizeram por mim e meus colegas e que muitos de vocês continuam fazendo, hoje entendo perfeitamente a importância e a beleza do papel de cada um de vocês e amanhã serei mais um colega na batalha diária que pesquisadores e educadores enfrentam pela frente.

Também agradeço ao coorientador deste TCC, professor Alcir Luiz Dafre, por todos os ensinamentos como professor da temida Bioquímica, nos experimentos, seminários, amizade e principalmente por ter me dado a oportunidade de entrar em seu laboratório, Laboratório de Defesas Celulares – LABDEF, onde conheci tantos colegas e amigos, os quais foram de valor inestimável para minha graduação e formação como profissional. A estes companheiros, Trevisan, Ariana, Luiz, Mariana, Miriam, Dani, Daiane, Anderson, Naissa, fica minha gratidão pela amizade, companheirismo, risadas, experimentos, ensinamentos e paciência de vocês.

Em especial, agradeço ao meu orientador e colega de laboratório Rafael Trevisan, que além de sua amizade, me ensinou muito, com muita paciência (em geral), em muitas e muitas horas de trabalhos e diversos experimentos ao longo de minha permanência no LABDEF. Ressalto ainda sua inestimável ajuda na confecção deste trabalho, no qual através de seu auxílio e orientação pude aprender muito e, sem dúvida, guardarei estes ensinamentos para minha vida pessoal e profissional.

Agradeço muito minha namorada Francis, por seu carinho, paciência, amizade companheirismo, compreensão e pelo seu amor, que, sem dúvida, fizeram parte deste trabalho, mesmo que indiretamente, amo você.

Por fim, agradeço as agências de fomento à pesquisa FAPESC, CNPq, CAPES, e também ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia – Toxicologia Aquática (INCT-TA), que permitiram a realização deste trabalho.

RESUMO

O sistema antioxidante é um importante mecanismo de defesa, o qual visa à manutenção da homeostase celular. Este trabalho teve como objetivo melhor caracterizar a modulação de parâmetros relacionados ao sistema antioxidante e de biotransformação de xenobióticos de fase II. Brânquias e glândula digestiva foram estudadas em ostras do pacífico *Crassostrea gigas*, expostas via água do mar por até 24 hrs ao composto eletrofilico sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), conhecido por sua capacidade de promover distúrbios no sistema antioxidante. Um experimento adicional foi realizado utilizando N-etilmaleimida (NEM) visando comparar o padrão de alteração dos níveis de GSH na brânquia com a glândula digestiva causados por estes compostos. O efeito do CDNB foi evidenciado apenas nas brânquias: (i) foi verificada uma rápida e intensa diminuição dos níveis de GSH após 4 h (~60%), 10 h (~79%) e 24 h (~87%). (ii) Além disso, foi observado, neste mesmo tecido, uma diminuição progressiva da atividade das enzimas antioxidantes GR e TrxR, com uma inibição de 50-60% após 24 h; e (iii) um rápido aumento (75%) na atividade da enzima de biotransformação glutatona S-transferase (GST) ao final do tratamento. A enzima, γ -glutamil transpeptidase, e os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) não apresentaram alterações. É evidente o efeito deletério do CDNB sobre as defesas antioxidantes destes animais, o qual também pode ser evidenciado pela indução de mortalidade (33%) após uma exposição contínua por 96 h. Já no caso da NEM, nas brânquias foi observada uma diminuição de cerca de 70% nos níveis de GSH, chegando a 80% na maior concentração utilizada. Um segundo delineamento experimental foi utilizado para investigar se o consumo de GSH na glândula digestiva poderia ocorrer na ausência da brânquia como uma primeira barreira de absorção destes compostos. Para isto, NEM foi injetada no músculo adutor e os níveis de GSH foram analisados. Na brânquia houve uma diminuição de ~ 52%, chegando em ~ 98% na maior concentração utilizada, além disso, foi verificada também a diminuição nos níveis de GSH-t na glândula digestiva nos grupos de maior concentração, aproximadamente 33% e 90%. Em conjunto, os dados indicam para um evidente papel da brânquia na proteção destes animais contra agentes eletrofilicos e que este tecido impõe uma barreira inicial de metabolização através de um sistema dependente de GSH. Esta barreira aparentemente protege outros órgãos contra o ataque de substâncias eletrofilicas com potencial pró-oxidante e tóxico.

Palavras-chave: CDNB, antioxidantes, glutatona, bivalves, ostras, *Crassostrea gigas*, brânquias, glândula digestiva

ABSTRACT

The antioxidant system is an important defense mechanism, which aims to maintain the cellular redox homeostasis. The aim of this study was to characterize the modulation parameters related to the antioxidant system and phase II biotransformation of xenobiotics. Gills and digestive gland were studied in pacific oysters *C. gigas*, exposed via sea water up to 24 hours to synthetic eletrophilic compound 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), known for been capable of causing disturbances on the antioxidant system. An additional experiment was performed using N-etilmaleimide (NEM) to compare the pattern of GSH response to these two electrophilic compounds. The CDNB effect was seen only in the gills: (i) a rapid and marked decrease in GSH levels after 4 hours (~ 60%) was observed, 10h (~ 79%) and 24 hours (~ 87%). (ii) Furthermore, it was also observed in the same tissue: progressive decrease in the activity of the enzymes glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (TrxR) with a 50-60% inhibition after 24 hours; (iii) rapid response of biotransformation enzyme glutathione S-transferase (GST), with a 75% increase in its activity at the end of treatment. The enzyme related to the metabolism of GSH, γ -glutamyl transpeptidase, and the levels of lipid peroxidation (TBARS) showed no significant changes during the treatment period for both tissues. It is clear the harmful effect of CDNB on the antioxidant capacity of these animals, which can also be evidenced by the induction of mortality (33%) after continuous exposure for 96 h. In the case of NEM, in the gills was observed a decrease of about 70%, reaching 80% in the higher concentration. A second experiment was used to investigate if the use of GSH in the digestive gland could occur in the absence of the gills as a first barrier for the absorption of these compounds. Therefore, NEM was injected into the adductor muscle and GSH levels were analyzed. In gills there was a decreased ~ 52%, reaching a maximum decrease (~ 98%) in the higher concentration, in addition was also noticed the decrease in GSH levels in the digestive gland in groups of higher concentration, about 33% and 90%,. Together, the data indicate a clear role for the gills in the protection of these animals against electrophilic agents, imposing an initial barrier metabolism, apparently protecting other organs of a larger import of substances with pro-oxidant and toxic potencial.

Key-words: CDNB, antioxidants, glutathione, bivalves, oysters, *Crassostrea gigas*, gills, digestive gland

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Desenvolvimento e o custo ambiental.....	1
1.2 Moluscos bivalves como organismos modelo para estudos ecotoxicológicos e sua importância para Santa Catarina.....	2
1.3 Biomarcadores de estresse oxidativo – espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante.....	3
1.3.1 Espécies reativas de oxigênio.....	3
1.3.2 Sistema antioxidante.....	5
1.4 Metabolismo de xenobióticos.....	8
1.5 Compostos sintéticos como modelos de estudos de estresse oxidativo e sistema antioxidante.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo principal.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Animais.....	17
4.2 Exposição ao CDNB.....	17
4.3 Exposição a NEM.....	17
4.4 Coleta de tecidos.....	18
4.5 Preparação de tecidos para análises bioquímicas.....	18
4.5.1 Níveis de glutathiona total (GSH-t).....	18
4.5.2 Atividade enzimática da glutathiona redutase (GR), tioredoxina redutase (TrxR) e glutathiona-S-transferase (GST).....	18
4.5.3 Atividade enzimática da γ -glutamil transpeptidase (GGT).....	18
4.5.4 Níveis de peroxidação lipídica (TBARS).....	19
4.6 Análises Bioquímicas.....	19
4.6.1 Concentração de proteínas.....	19
4.6.2 Níveis de glutathiona total (GSH-t).....	19
4.6.3 Atividade enzimática da glutathiona redutase (GR).....	19
4.6.4 Atividade enzimática da glutathiona-S-transferase (GST).....	19
4.6.5 Atividade enzimática da tioredoxina redutase (TrxR).....	20
4.6.6 Atividade enzimática da γ -glutamil transpeptidase (GGT).....	20
4.6.7 Níveis de produtos finais da peroxidação lipídica (TBARS).....	20
4.7 Toxicidade aguda do CDNB 10 μ M.....	20
4.8 Análises Estatísticas.....	21
5. RESULTADOS.....	23

5.1 Exposição ao CDNB.....	23
5.1.1 Níveis de GSH-t.....	23
5.1.2 Atividade das enzimas antioxidantes.....	23
5.1.3 Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e verificação da toxicidade do CDNB 10 μ M.....	25
5.1.4 Comparação entre os níveis de parâmetros relacionados ao sistema antioxidante e de biotransformação em brânquia e glândula digestiva.....	25
5.2 Exposição a NEM.....	26
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÕES.....	35
8. REFERÊNCIAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécime de ostra <i>Crassostrea gigas</i>	2
Figura 2. Compostos intermediários de destaque gerados durante o metabolismo do oxigênio na mitocôndria e através da exposição a xenobióticos.....	4
Figura 3. Mecanismo simplificado de ação da glutathione peroxidase, utilizando GSH como doador de elétrons na detoxificação de H ₂ O ₂	6
Figura 4. Biossíntese de glutathione (GSH).....	7
Figura 5. Mecanismo simplificado do complexo peroxiredoxina/tioredoxina (Prx/Trx). A Prx reduz H ₂ O ₂ em água e utiliza Trx (SH) para se regenerar.....	8
Figura 6. Fases do metabolismo de xenobióticos.....	9
Figura 7. Mecanismo simplificado da conjugação da glutathione com um composto eletrofílico(C.E.) endógeno ou exógeno através da glutathione-S-transferase.....	9
Figura 8. Mecanismo de detoxificação de xenobióticos via ácidos mercaptúricos.....	10
Figura 9. Níveis de glutathione total em brânquias e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> , expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10µM por 24 horas.....	23
Figura 10. Atividades enzimáticas em brânquias e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> , expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10µM por 24 hrs.....	24
Figura 11. Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e verificação da toxicidade do CDBN 10 µM.....	25
Figura 12. Níveis de glutathione total em brânquias e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> , expostas in vivo a n-etilmaleimida (NEM) por 1 hora.....	27
Figura 13. Representação gráfica das formas de exposição e das principais conclusões deste trabalho.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores absolutos dos parâmetros bioquímicos analisados na brânquia e glândula digestiva de ostras <i>Crassostrea gigas</i> do grupo controle (0 horas).....	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Cat – catalase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DNP-SG – conjugado de glutationa
DNP-SG ATPase – transportador de adutos glutationa-dinitrofenóis
ERO – espécies reativas de oxigênio
GGT – γ -glutamil transpeptidase
GPX – glutationa peroxidase
GR – glutationa redutase
GSH – glutationa
GSH-t – glutationa total
GSSG – glutationa oxidada
GST – glutationa-S-transferase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
KPi – tampão fosfato de potássio
NAC – ácido mercaptúrico
NEM - N-etilmaleimida
PCA – ácido perclórico
Prx – peroxiredoxina
PSH – tióis proteicos
SH – grupamento tiol
SOD – superóxido dismutase
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Trx – tioredoxina
TrxR - tioredoxina redutase
TBA – ácido tiobarbitúrico

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento econômico e o custo ambiental.

O desenvolvimento econômico atual, de raízes mais expressivas na Revolução Industrial, significou um intenso e extenso processo de industrialização e urbanização, levando ao crescimento econômico e populacional atrelado a inúmeros e grandes desafios, principalmente do ponto de vista da sustentabilidade ambiental (FREITAS; PORTO, 2006). Isto porque concomitante ao desenvolvimento econômico encontra-se a contaminação ambiental: presença no ambiente (água, ar ou solo) de qualquer agente (físico, químico ou biológico) em quantidade suficiente para desequilibrar as propriedades do meio e que possam ser nocivos para a saúde, segurança ou bem-estar do ser humano ou biota local, sendo assim prejudiciais à sua preservação. Estes distúrbios também podem ocorrer naturalmente, no caso de catástrofes naturais como secas e queimadas, mas recentemente encontram-se intimamente atrelados à ação antrópica (SHAHIDUL ISLAM; TANAKA, 2004).

O ambiente aquático possui uma complexa rede de relações e interações entre diversos reinos, detendo um papel fundamental na manutenção de vários outros ecossistemas e também em inúmeras atividades econômicas brasileiras (SARMENTO; DURÃO; DUARTE, 2005). Entretanto, este ambiente é potencialmente vulnerável à poluição, uma vez que quase todos os tipos de produtos químicos utilizados em atividades antropogênicas podem atingir diretamente ou indiretamente os corpos d'água (GIRÓN-PÉREZ et al., 2013).

A presença de contaminantes no ambiente aquático tem sido denotada em vários estudos ao redor do mundo, incluindo a contaminação de águas subterrâneas por contaminantes orgânicos sintéticos (POSTIGO; BARCELÓ, 2014). No Brasil, a contaminação de ambientes aquáticos também já é amplamente discutida, como por exemplo, a contaminação na Marina da Glória, (praia do Flamengo – RJ), provavelmente decorrente de contribuição do esgoto doméstico e do lançamento de diesel e óleo combustível (TROVÃO; CARREIRA, 2009). Contaminação por derramamento de combustíveis já causou uma redução da riqueza e na população de invertebrados (COUCEIRO et al., 2006), podendo também levar à redução do pH e conseqüentemente aumentar a solubilidade de metais na água, sendo a maioria destes potencialmente tóxicos para a biota aquática (JIMENEZ et al., 2004; KIM et al., 2014).

Estes são alguns exemplos de substâncias tóxicas as quais os animais aquáticos estão potencialmente em contato, oriundas das mais diversas fontes. Estas substâncias são

denominadas xenobióticos: substâncias exógenas aos seres vivos que não são naturalmente produzidas ou esperadas de estarem presentes em um determinado organismo (BIECZYNSKI et al., 2014). Os efeitos adversos oriundos da ação de xenobióticos em organismos aquáticos incluem letalidade, distúrbios no crescimento, fertilidade, comportamento, além de alterações a níveis celulares e moleculares como inibições enzimáticas, perturbação da homeostase celular, da integridade de membranas, danos a macromoléculas, entre outros (FENT, 2004). Estes e outros efeitos denotam o quanto a ação humana pode ser danosa ao meio ambiente, demonstrando a importância de se monitorar, avaliar os efeitos e buscar medidas visando a manutenção e o bem-estar desses ambientes e de sua biota.

1.2 Moluscos bivalves como organismos modelo para estudos ecotoxicológicos e sua importância para Santa Catarina.

O estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de moluscos bivalves (mais de 90%), sendo as principais áreas de cultivo localizadas nos municípios de Palhoça, Florianópolis, Biguaçu, Governador Celso Ramos, Bombinhas, São Francisco do Sul, Balneário Camboriú, Balneário Barra do Sul, Penha, Itapema, Porto Belo e São José. Aproximadamente 90% da produção de ostras é originária da Baía Norte e Sul (Florianópolis, Palhoça, São José, Biguaçu e Governador Celso Ramos), com destaque para a região do Ribeirão da Ilha, onde se concentra a maior produção de ostras (EPAGRI, 2014). Dentre as espécies produzidas no mundo, a ostra *Crassostrea gigas* (Fig. 1) se destaca por possuir um crescimento rápido e tolerância ampla às condições ambientais, tornando-se a espécie preferencial para o cultivo de ostras em muitas regiões do mundo (FAO, 2014).

Figura 1. Espécime de ostra *Crassostrea gigas*.



Fonte: FAO (2015).

O município de Florianópolis não possui rede coletora de esgoto em todos os seus distritos (IBGE, 2000,2008), podendo ocorrer a emissão de efluentes domésticos diretamente para o mar em algumas regiões do município. Por exemplo, o polo de maricultura Ribeirão da Ilha, já apresentou este tipo de problema em 2014 com uma ocasião de balneabilidade “imprópria” de acordo com análises de qualidade da água por órgãos governamentais (FATMA, 2014). Esta problemática ambiental não é restrita apenas ao município de Florianópolis, com a qualidade da água podendo causar efeitos adversos em bivalves marinhos, não apenas em áreas de cultivo, mas também em ambientes naturais. Neste contexto, moluscos bivalves são animais amplamente utilizados como modelos de estudo em laboratório e em campo. Entre as características favoráveis desses organismos estão: a) sésseis (maioria), diminuindo problemas como fugas dos animais, b) alta capacidade de bioacumulação, proporcionando uma relativa maior estabilidade da concentração de exposição aos contaminantes, c) bastante resistentes e d) de fácil manutenção em laboratório (RITTSCHOF; MCCLELLAN-GREEN, 2005).

1.3 Biomarcadores de estresse

1.3.1 Espécies reativas de oxigênio

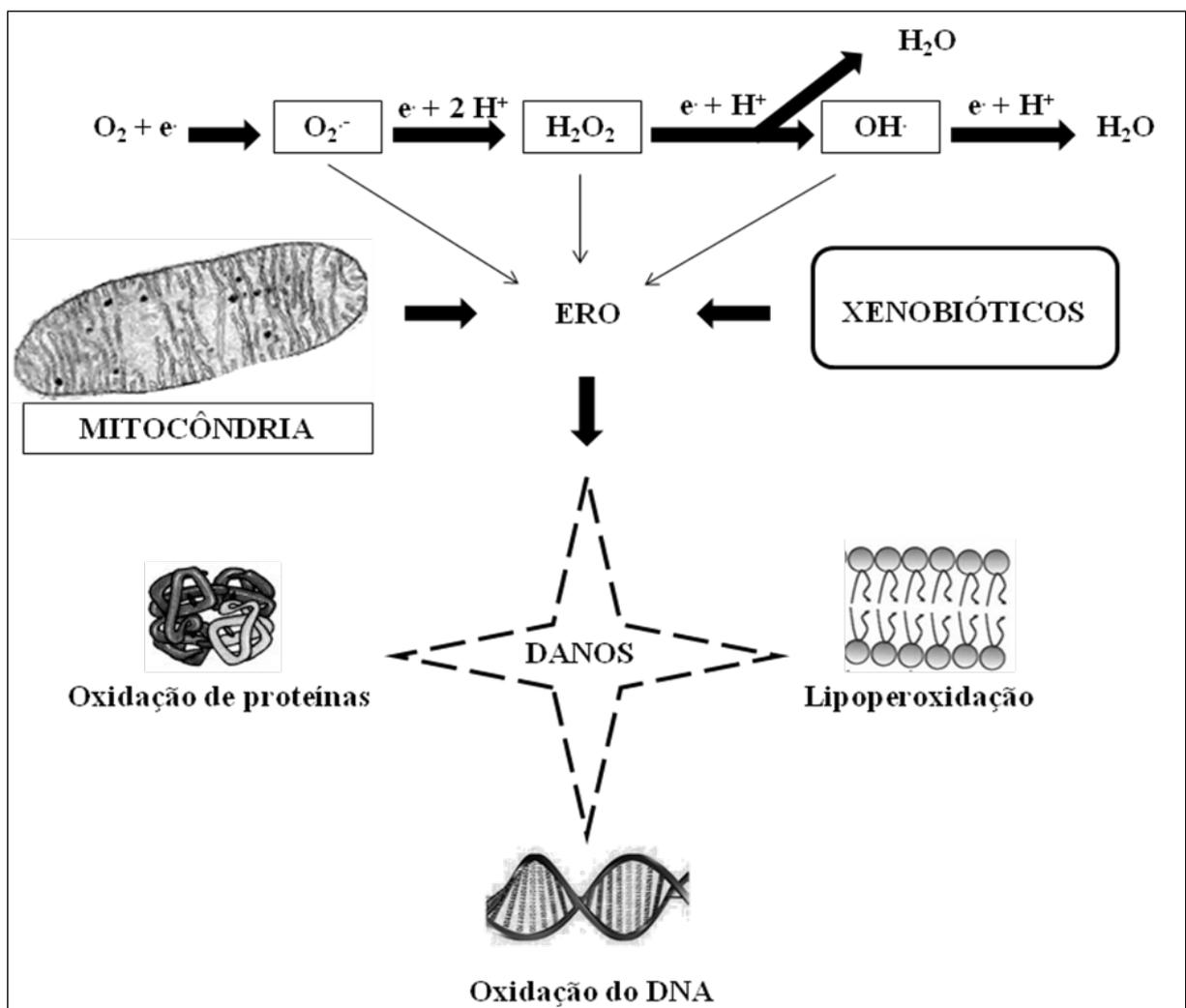
Diferentes parâmetros biológicos podem estar alterados como consequência da interação entre substâncias xenobióticas e o organismo (GIRÓN-PÉREZ et al., 2013). Muitas vezes, essas alterações são utilizadas como biomarcadores de contaminação ambiental, uma vez que muitas delas são mensuráveis e podem caracterizar os efeitos de contaminantes ambientais nos organismos. Neste contexto, um biomarcador pode ser definido como qualquer resposta biológica a estas substâncias no indivíduo ou parte dele, a qual demonstre uma alteração do estado normal do organismo, integrando sistemas biológicos operacionais e indicando processos de contaminação ou intoxicação que possam ser medidos no organismo. Através desses biomarcadores espera-se prever ou demonstrar a incidência de um acontecimento ou doença (WHO, 2001). Por exemplo, existem os biomarcadores bioquímicos, considerados como sistemas de alerta, que indicam possíveis eventos de contaminação ambiental antes de efeitos nocivos mais severos aos organismos e, conseqüentemente, aos ecossistemas (MCCARTHY; SHUGART, 1990).

Biomarcadores relacionados ao sistema antioxidante e estresse oxidativo são amplamente utilizados em monitoramentos ambientais dos ecossistemas marinhos e de água doce (LUSHCHAK, 2011), sendo um antioxidante definido como qualquer substância que, uma vez presente em menores concentrações que o substrato oxidável, atue de maneira a atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O

estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio em favor dos oxidantes entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (revisado por LUSHCHAK, 2011).

Entre esses compostos oxidantes, merecem destaque as espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies químicas presentes na maioria dos sistemas biológicos, oriundas do metabolismo energético dependente do oxigênio. A ação das ERO pode levar a processos de danos celulares, como a oxidação de proteínas e ácidos nucleicos, além de peroxidação de lipídios (Fig. 2), os quais podem causar transtornos em membranas celulares, vias metabólicas e no material genético, afetando o funcionamento celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 2. Compostos intermediários de destaque gerados durante o metabolismo do oxigênio na mitocôndria e através da exposição a xenobióticos. Se as ERO geradas não forem eficientemente metabolizadas, podem levar a subsequentes danos oxidativos, como a oxidação de proteínas, oxidação de ácidos nucleicos, e lipoperoxidação. Ânion superóxido – O_2^- ; peróxido de hidrogênio – H_2O_2 ; radical hidroxila – $OH\cdot$.



Alguns poluentes, como metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, são compostos capazes de induzir estresse oxidativo em bivalves, podendo ter efeitos subletais e alterar a saúde desses organismos (GIRÓN-PÉREZ et al., 2013). Desta forma, torna-se importante a atuação de um sistema capaz de combater os efeitos desse estresse celular.

1.3.2 Sistema antioxidante

O sistema antioxidante existe nos animais para inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria de compostos oxidantes do meio. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação de ERO, neutralizando o excesso de ERO formadas ou ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (BARBOSA et al., 2010; LUSHCHAK, 2011). O sistema antioxidante é composto por uma série de proteínas, enzimas e substâncias capazes de agir em conjunto para neutralizar as ERO, reduzindo-as a compostos de menor reatividade (LUSHCHAK, 2011). Usualmente é dividido em (i) enzimático, onde ocorre a ação de enzimas por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de ERO a fim de evitar sua propagação e o acúmulo de danos oxidativos; e (ii) não-enzimático, sendo constituído por uma grande variedade de substâncias que podem ter origem endógena ou dietética, com capacidade de neutralizar ERO (CLARKSON; THOMPSON, 2000). Exemplos de ambas as classes de antioxidantes serão discutidos a seguir.

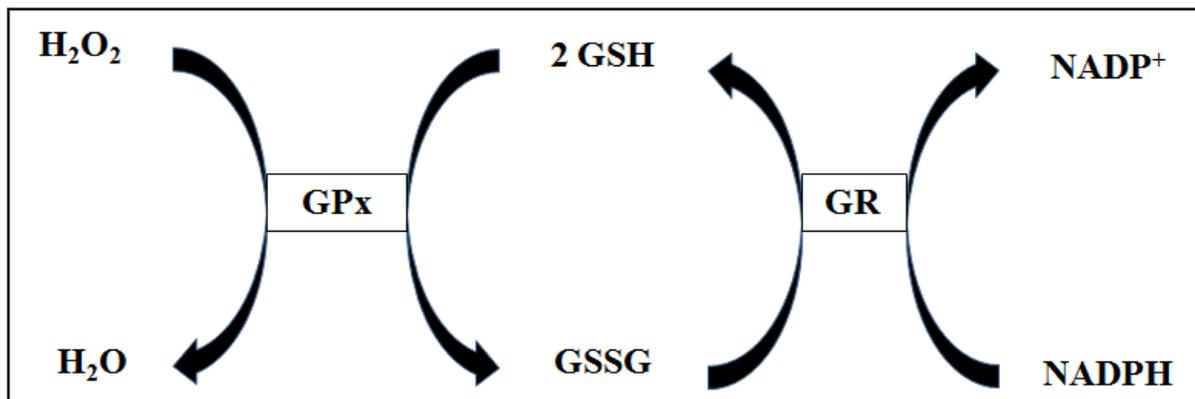
A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que age protegendo os alvos do ataque do ânion superóxido (O_2^-), gerado, principalmente a nível mitocondrial. Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas, no citosol a forma SOD-CuZn (com cobre e zinco em seu sítio ativo), e na mitocôndria a forma SOD-Mn (com manganês em seu sítio ativo). Ambas isoformas de SOD agem transformando o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 gerado é então metabolizado pela enzima catalase (Cat), uma hemoproteína, responsável pela dismutação do H_2O_2 , a qual possui a capacidade de transformá-lo em água e oxigênio, sendo encontrada principalmente nos peroxissomos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A glutathiona (GSH, um tiól não proteico) é um antioxidante não-enzimático, tripeptídeo composto por γ -glutamil-cisteinil-glicina. Possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo, atuando contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos. Sua capacidade antioxidante está relacionada ao grupamento tiol (SH) reativo de sua cisteína, também

encontrado em proteínas, os tióis proteicos (PSH) ou em tióis de baixo peso molecular, como a cisteína e a própria GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUBER; ALMEIDA; DE FATIMA, 2008).

A glutathione peroxidase (GPx) atua na detoxificação de peróxidos orgânicos e de hidrogênio, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como doadora de elétrons para a redução do H_2O_2 a água. Porém, neste processo a GSH é oxidada, gerando o dissulfeto da glutathione ou glutathione oxidada (GSSG). Como o ambiente intracelular é fisiologicamente redutor, a razão entre glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG), é mantida em níveis elevados através da constante redução da GSSG feita pela enzima glutathione reductase (GR) (utilizando elétrons do NADPH) (Figura 3) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 3. Mecanismo simplificado de ação da glutathione peroxidase, utilizando GSH como doador de elétrons na detoxificação de H_2O_2 . Glutathione peroxidase – GPx; glutathione – GSH; glutathione oxidada – GSSG; glutathione reductase – GR; peróxido de hidrogênio – H_2O_2 .



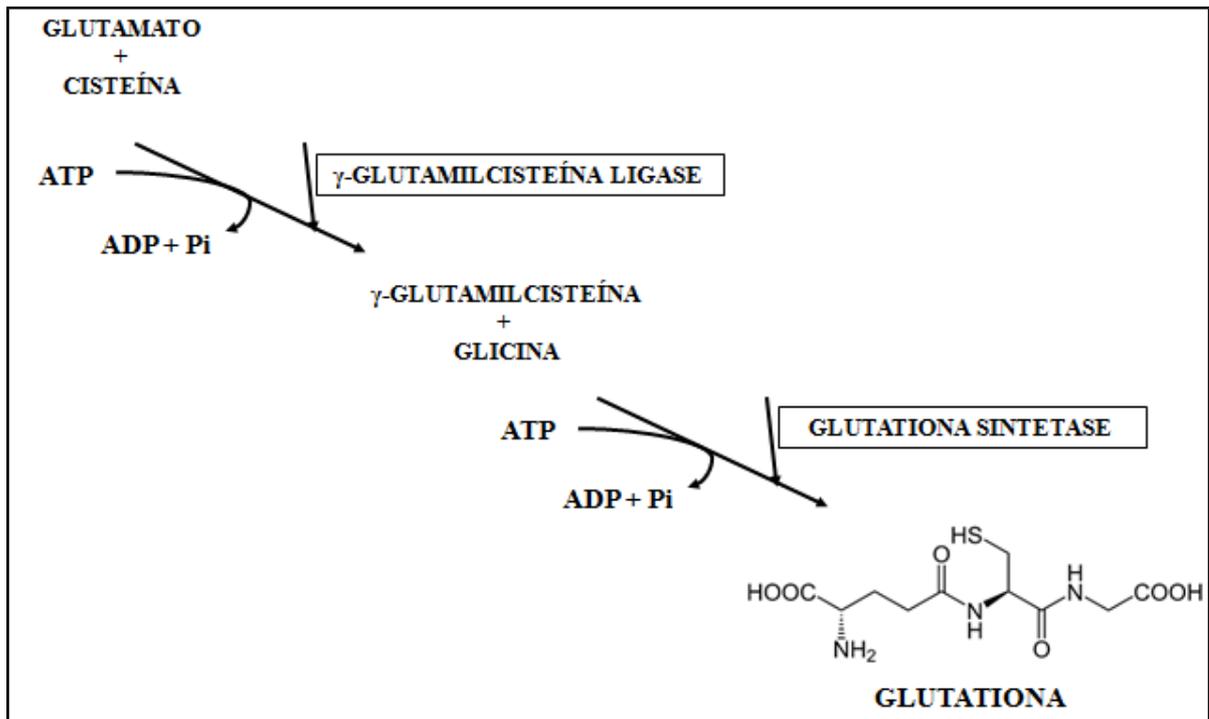
Fonte: CHAMPE; HARVEY (1997); HALLIWELL; GUTTERIDGE (2007).

Além da constante redução de GSSG à GSH via GR, a GSH também pode ser sintetizada para suprir as necessidades celulares. A biossíntese de GSH ocorre em duas etapas dependentes de ATP. Na primeira reação é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e cisteína, catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína ligase, levando à formação de γ -glutamilcisteína. Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutathione sintetase (Fig. 4) (HUBER et al., 2008).

Ainda com relação ao metabolismo da GSH, a enzima γ -glutamyl transpeptidase (GGT) fica ligada na monocamada externa da membrana celular e faz a remoção dos grupamentos γ -glutamyl da GSH do meio extracelular, gerando o dipeptídeo cisteína-glicina para posterior metabolização e reabsorção. A síntese intracelular de GSH depende de um constante fluxo de seus aminoácidos precursores. Desta forma, estas etapas são fundamentais

para permitir a disponibilização de cisteína, aminoácido limitante para a síntese de GSH assim como de proteínas com grupamentos tiólicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

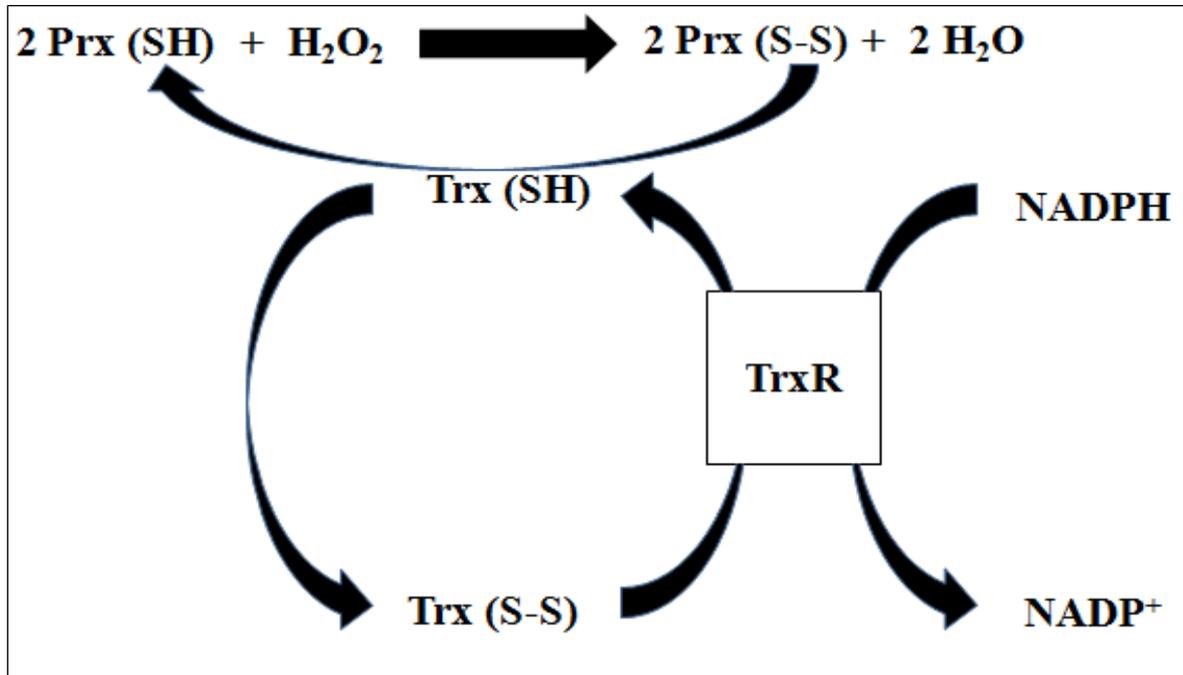
Figura 4. Biossíntese de glutathiona (GSH). É um tiol formado pelos resíduos de γ -glutamil, cisteína e glicina, tendo sua formação dividida em duas etapas dependentes de ATP: a primeira formando a γ -glutamilcisteinilglicina e a segunda gerando GSH.



Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE (2007).

A peroxiredoxina (Prx) também reduz o peróxido de hidrogênio em água. Ela o faz utilizando elétrons da tioredoxina (Trx), em um processo que ocorre através da atuação do chamado sistema peroxiredoxina/tioredoxina (Prx/Trx). A Prx reduz o H_2O_2 a água, tornando-se oxidada neste processo e utilizando os elétrons da Trx para retornar a seu estado reduzido. A Trx, recém-oxidada por regenerar a Prx, é reduzida para sua forma original pela enzima Trx redutase (TrxR), consumindo NADPH e garantindo o constante fluxo de elétrons para o ciclo catalítico do complexo Prx/Trx (Fig. 5) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 5. Mecanismo simplificado do complexo peroxidoredoxina/tioredoxina (Prx/Trx). A Prx reduz H_2O_2 à água e utiliza Trx (SH) para se regenerar. A Trx é constantemente reciclada com auxílio da TrxR e NADPH. Peroxidoredoxina reduzida – Prx (SH); peroxidoredoxina oxidada – Prx (S-S); tioredoxina reduzida – Trx (SH); tioredoxina oxidada – Trx (S-S); tioredoxina redutase – TrxR; peróxido de hidrogênio – H_2O_2 .

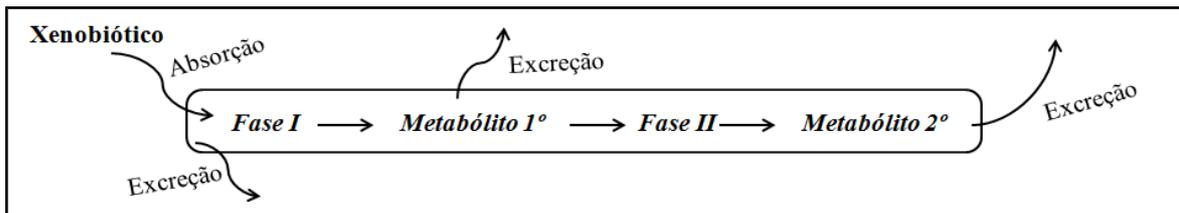


Fonte: CHAMPE; HARVEY (1997); HALLIWELL; GUTTERIDGE (2007).

1.4 Metabolismo de xenobióticos.

Os xenobióticos podem interagir de maneira deletéria ao organismo, sendo muito importante a sua eliminação. Este processo é bem conhecido em mamíferos, porém comparativamente pouco estudado em bivalves. Pode ser classificado em três fases distintas, porém estritamente relacionadas: fase I, II e excreção. Nas fases I e II, geralmente se observa a transformação do xenobiótico em um metabólito com maior peso molecular e solubilidade em água, além de menor toxicidade. Por fim, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados. Também pode haver excreção diretamente após a absorção do composto (sem ocorrer a fase I e II de biotransformação), assim como logo após a metabolização via fase I (Fig. 6) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUBER et. al, 2008).

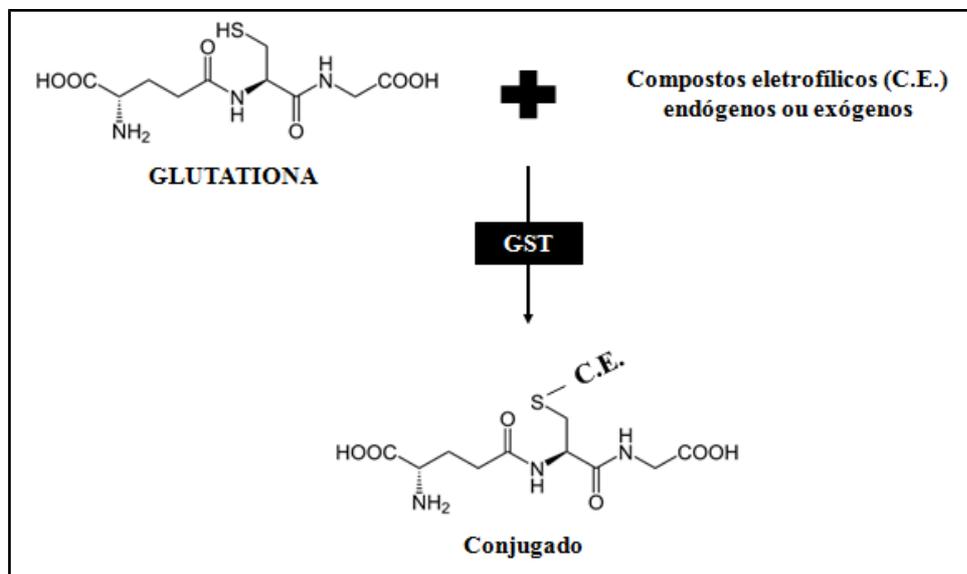
Figura 6. Fases do metabolismo de xenobióticos.



Fonte: HUBER et. al (2008).

A maioria dos processos da fase I é mediada principalmente pelas enzimas citocromo P450, que são responsáveis pela ativação (inserção de grupos funcionais) dos xenobióticos via oxidação. As enzimas da fase II catalisam a conjugação dos xenobióticos (ou de seus metabólitos oriundos da fase I) com substratos endógenos (como a GSH) tornando-os mais hidrossolúveis e passíveis de excreção (HAMILTON et al., 2003; BARBOSA et al., 2010). A formação de conjugados com a GSH é a principal reação observada para muitos xenobióticos durante a fase II (Fig.7) (SHEEHAN et al., 2001).

Figura 7. Mecanismo simplificado da conjugação da glutathiona com um composto eletrofilico(C.E.) endógeno ou exógeno através da glutathiona-S-transferase. Glutathiona – GSH; glutathiona-S-transferase – GST.



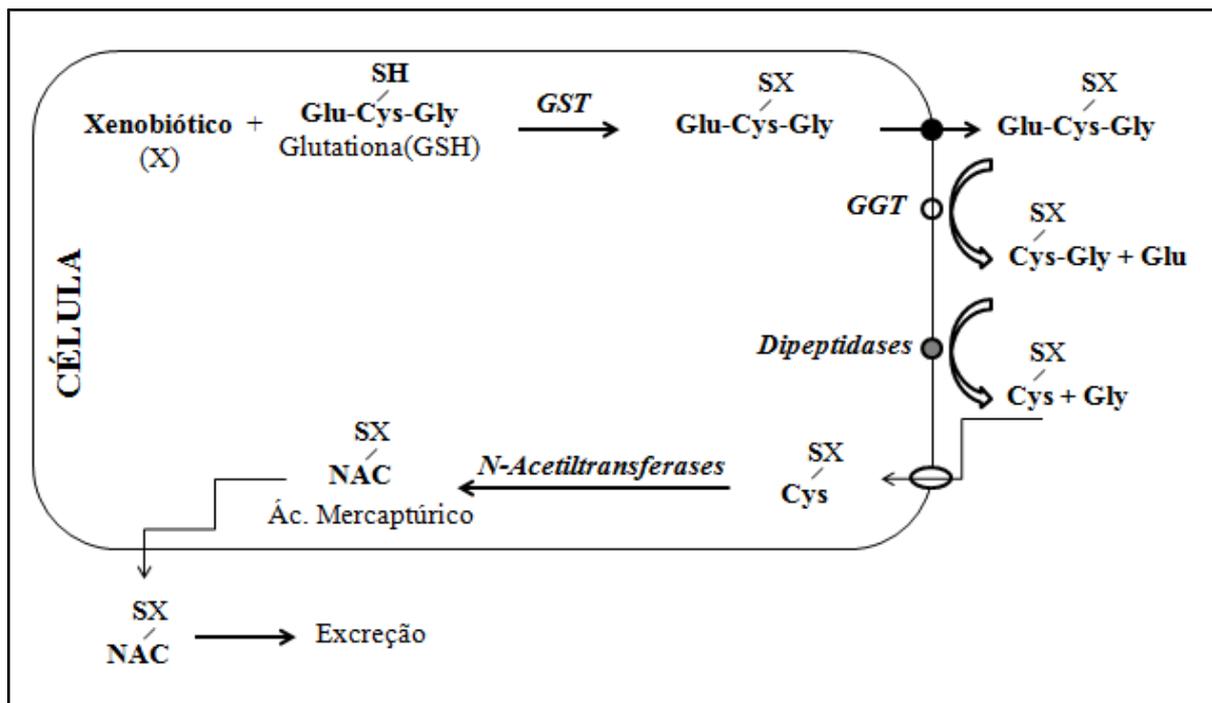
Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE (2007).

A fase II do metabolismo de xenobióticos é um importante passo para a eliminação destes metabólitos, tais como substâncias eletrofilicas. Compostos eletrofilicos são substâncias capazes de aceitar pares de elétrons formando ligações covalentes. Desde modo, estas substâncias são reativas e podem formar adutos com biomoléculas, como DNA e proteínas. Após conjugação, via sistema da glutathiona-S-transferase (GST) por exemplo, os compostos eletrofilicos podem ser exportados da célula, envolvendo a participação de

transportadores, como no caso dos transportadores dos conjugados de GSH-xenobióticos (Fig. 7 e 8) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUBER et. al, 2008).

A atuação de várias isoenzimas da GST ocorrem em paralelo à de eliminação dos conjugados de glutathiona para fora da célula e posterior metabolização pela via do ácido mercaptúrico. Uma vez formados, os conjugados GSH-xenobióticos são reconhecidos por transportadores específicos e conduzidos para o meio extracelular (Fig. 7 e 8) (SHEEHAN et al., 2001). Em seguida, estes conjugados são metabolizados pela ação das enzimas GGT e dipeptidases presentes na monocamada externa da membrana celular (Fig. 8) (HAMILTON et al., 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), conforme descrito a seguir.

Figura 8. Mecanismo de detoxificação de xenobióticos via ácidos mercaptúricos. Glutathiona – GSH; γ -glutamil transpeptidase – GGT; Glutamato – Glu; Glicina – Gly; Cisteína – Cys; NAC – ácido mercaptúrico.



Fonte: Adaptado de HUBER et. al (2008).

A primeira etapa de eliminação dos conjugados da glutathiona envolve a remoção de um resíduo de glutamato (γ -glutamil) pela GGT (Fig. 8), posteriormente ocorrendo a clivagem de um resíduo de glicina por dipeptidases, restando apenas o resíduo da cisteína ligada ao xenobiótico. O glutamato e a glicina livres podem ser reabsorvidos e reutilizados pela célula. O conjugado de cisteína é então recaptado pela célula, onde o grupo amino do resíduo de cisteína é acetilado pela ação de *N*-acetiltransferases intracelulares, gerando o correspondente ácido mercaptúrico para excreção (HAMILTON et al., 2003). Este processo

não corre necessariamente no mesmo tecido ou órgão, podendo envolver a integração de diferentes tipos celulares (HINCHMAN; BALLATORI, 1994).

É importante lembrar que a GSH é o segundo metabólito livre mais abundante na célula, atrás apenas do glutamato (BENNET; KIMBALL; GAO, 2009). Desta forma, é evidente que mecanismos de detoxificação *via* glutathiona possam representar uma adaptação biológica fundamental (VAN BLADEREN, 2000).

1.5 Compostos sintéticos como modelos de estudos de estresse oxidativo e sistema antioxidante

Os efluentes podem possuir uma vasta variedade de poluentes, metais pesados e outros produtos químicos/orgânicos (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005; POSTIGO; BARCELÓ, 2014), a maioria com potencial oxidante, tornando as células dos animais expostos suscetíveis a danos por ERO (WINSTON; GIULIO, 1991). Por outro lado, a adaptação pode ser alcançada caso as defesas antioxidantes sejam eficientes para contrabalançar os distúrbios provocados (FENT, 2004). Sendo assim, apesar de enfrentar uma condição adversa, o animal pode sobreviver a uma exposição a poluentes ambientais e tornar-se mais ou menos sensível a posteriores estresses, baseado na sua resposta celular. Além disso, os organismos podem acumular contaminantes ambientais e subsequentemente contaminar outros organismos em níveis tróficos superiores (HONG et al., 2014).

O composto eletrofílico sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, um derivado do benzeno), é utilizado como modelo em várias investigações bioquímicas envolvendo a biotransformação de fase II, estresse oxidativo e o sistema antioxidante com os mais diversos alvos como bactérias, nemátodos, camundongos e peixes (CATTERALL; KING; JOANNIDES, 2002; SHARMA; SULTANA, 2004; BIECZYNSKI et al., 2014; TIWARI et al., 2014). Isto porque o CDNB pode causar inibição em enzimas antioxidantes, depletar os níveis tióis celulares e formar conjugados de GSH (NORDBERG; ARNÉR, 2001; TIWARI et al., 2014, TREVISAN et. al, 2012). O CDNB entra nas células e é rapidamente conjugado com GSH pela enzima GST (Fig. 8), formando o conjugado 2,4-dinitrofenil-S-glutathiona (DNP-SG). Este composto é posteriormente metabolizado pela via do ácido mercaptúrico e excretado do organismo (RUDNEVA; KUZMINOVA; SKURATOVSKAYA, 2010).

Um outro composto também utilizado como modelo para compreender o sistema antioxidante é a N-etilmaleimida (NEM). Este alquilante reage com os grupos tióis celulares, como a GSH, causando sua depleção e podendo levar ao estresse oxidativo (GIBON et al., 2010). Desta forma, ela pode ser utilizada para investigar o papel da GSH em eventos celulares.

Neste contexto, compreender o funcionamento do sistema antioxidante em diferentes organismos é fundamental para garantir uma melhor base científica para estudos ecotoxicológicos. Isso pode ser obtido através de estudos em laboratório com estes compostos sintéticos, a fim de melhor caracterizar padrões de modulação e resposta deste sistema nos organismos de interesse.

2. JUSTIFICATIVA

O cultivo de bivalves faz parte de um importante setor da economia tanto do estado de Santa Catarina como para o município de Florianópolis, porém as condições ambientais nas quais esta criação é feita podem ser afetadas por diversos fatores, entre eles a contaminação da água. O sistema antioxidante desempenha um papel vital na modulação do metabolismo das ERO e na suscetibilidade dos organismos a eventos de estresse oxidativo (REGOLI et al., 2004), sendo que as modificações induzidas por ERO são a abordagem mais comum para avaliar este cenário (LUSHCHAK, 2011). Neste contexto, as variações nos níveis de antioxidantes e nos danos oxidativos têm sido utilizados como biomarcadores de contaminação aquática em diversos organismos (GIRÓN-PÉREZ et al., 2013).

A vantagem desse tipo de análise pode ser explicada quando comparada com estudos macroecológicos (populações, comunidades): neste caso, avaliar o nível de risco de inúmeros poluentes e seus derivados é complexo para se conduzir, uma vez que os efeitos tendem a se manifestar após exposições crônicas, além de estarem sujeitos a interferências por inúmeros fatores externos, dificultando sua detecção. Logo, elucidar os mecanismos iniciais (em níveis moleculares e/ou celulares) de resposta rápida, como as defesas antioxidantes e eventos de biotransformação, pode garantir uma compreensão mais rápida sobre a relação dos danos causados pelos xenobióticos (MOORE et al., 2004).

Inúmeros estudos já foram desenvolvidos com mamíferos para melhor compreender o funcionamento, regulação e importância do sistema antioxidante, porém com bivalves o esforço realizado nessa área é muito menor. É conhecido que as defesas antioxidantes podem atuar de maneiras distintas nos diferentes grupos animais, órgãos e tecidos (CLARKSON; THOMPSON, 2000; SHAHIDUL ISLAM; TANAKA, 2004; GIRÓN-PÉREZ et al., 2013).

Trabalhos do nosso grupo com ostras *C. gigas* e mexilhões *Perna perna* demonstraram que exposição a CDNB 10 μ M por 18 horas levou a diminuição dos níveis de GSH e PSH, além de inibir algumas enzimas antioxidantes na brânquia dos animais (TREVISAN et al., 2012, 2014). Além disso, também foi detectada a possível excreção de metabólitos derivados de CDNB na água do mar pelos organismos (TREVISAN et al., 2012).

Dessa forma, no presente trabalho, visamos utilizar o CDNB para elucidar as respostas antioxidantes decorrentes do estresse oxidativo causado pela presença deste composto, assim como possíveis eventos de biotransformação, visando compreender qual a contribuição de diferentes tecidos nestas respostas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Caracterizar o padrão de respostas antioxidantes e de biotransformação na brânquia e glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas ao agente eletrofilico CDNB.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os seguintes biomarcadores de estresse oxidativo:
 - a) Consumo de GSH durante a exposição e metabolização de CDNB.
 - b) Efeito do CDNB sobre as atividades enzimáticas da GR, TrxR, GGT e GST.
- Investigar se o distúrbio do sistema antioxidante leva a danos oxidativos e se pode estar associado a mortalidade causada pelo CDNB.
- Analisar o sistema de biotransformação de fase II através da análise dos níveis de GSH e atividade da enzima glutathione S-transferase durante exposição a CDNB.
- Comparar a resposta de consumo de GSH na brânquia e da glândula digestiva após exposição à CDNB e NEM.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Defesas Celulares – LABDEF, no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Os compostos químicos foram adquiridos da Sigma–Aldrich (Brasil) ou de marcas nacionais com qualidade para análise laboratorial.

4.1 Animais

Ostras *C. gigas* adultas (110 animais utilizados no total), com tamanho entre 7 e 12 cm de comprimento e de ambos os sexos, foram obtidas da Fazenda Marinha Atlântico Sul, localizada na Costeira do Ribeirão da Ilha - Florianópolis/SC. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados por no mínimo 7 dias em aquários de plástico com 1 litro de água do mar por animal. A água foi filtrada e esterilizada com radiação ultravioleta e mantida com salinidade entre 32 e 35‰. Além disso, o ambiente contava com um ciclo de luz 12/12 horas claro/escuro, e temperatura variando entre 18-20°. Os animais foram alimentados somente durante o período de aclimação com ração à base de fitoplâncton comercial da marca SeraCoraliquid (Alemanha) a cada dois dias e a água dos aquários trocada também a cada dois dias.

4.2 Exposição ao CDNB

Os animais (N = 6/grupo) foram divididos em 4 grupos para a exposição ao CDNB 10 μM (0 h- controle, 4 h, 10 h e 24 h), totalizando 24 animais. Cada aquário foi preenchido com 1 L de água do mar por animal, totalizando 6 L de volume final. A concentração e os tempos de exposição foram baseados em trabalhos anteriores do grupo com este composto (TREVISAN et al., 2012, 2014). Este experimento foi realizado duas vezes (48 animais no total), totalizando 12 animais/grupo.

O CDNB foi inicialmente diluído em etanol e em seguida na água do mar, atingindo a concentração final de etanol de 0,01% (incluindo o grupo controle, 0 h).

4.3 Exposição a NEM

Os animais foram divididos em 5 grupos de exposição a NEM via água do mar (0 μM - controle, 1 μM , 10 μM , 100 μM e 1000 μM), com 3 animais/grupo, totalizando 15 animais. Tendo em vista que este composto é permeável à membrana plasmática e reage rapidamente com os grupos tiólicos celulares (GIBON et al., 2010), os animais foram expostos a NEM apenas por 1 h. Cada aquário foi preenchido com 1 L de água do mar por animal, totalizando 3 L. A NEM foi preparada diretamente em água do mar, não sendo necessária a utilização de outros solventes.

Em outro experimento, a NEM foi disponibilizada para os os animais por via sistêmica, através da injeção diretamente no músculo adutor. Os animais foram divididos em 4 grupos (4 animais/grupo, totalizando 16 animais): controle (injeção de água do mar), NEM 10 μmol , NEM 100 μmol e NEM 300 μmol . As doses foram preparadas em 1 ml de água do mar filtrada e injetadas no músculo adutor, seguido de exposição por 1 hora. Estes valores equivalem a uma exposição de NEM 10, 100 e 300 μM via água do mar (utilizando 1 L de água do mar por animal e supondo 100% de absorção).

Enquanto a exposição de NEM via água do mar visa atingir inicialmente a brânquia, a injeção intramuscular espera atingir a hemolinfa e conseqüentemente o resto do organismo sem a ação inicial da brânquia. Ambos os experimentos foram realizados duas vezes, totalizando 6 animais/grupo para exposição via água do mar (30 animais utilizados) e 8 animais/grupo para exposição intramuscular (32 animais utilizados).

Para exposição a NEM foram avaliados os níveis de glutatona total (GSH-t), descrito na seção 4.6.1.

4.4 Coleta de tecidos

Ao final dos experimentos com CDNB e NEM a brânquia e a glândula digestiva foram coletadas para análises bioquímicas. Os tecidos coletados para análise de GSH foram processados imediatamente após a coleta, enquanto que as demais amostras foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análises.

4.5 Preparação de tecidos para análises bioquímicas

4.5.1 Níveis de glutatona total (GSH-t)

Foram pesados 50 mg de brânquia e glândula digestiva em microtubos aos quais foram adicionados 250 μL de ácido perclórico (PCA) 0,5M. Em seguida as amostras foram homogeneizadas, adicionados mais 250 μL de PCA 0,5M e centrifugadas a 15.000 x g por 2 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi coletado (50 μL) e adicionado 450 μL de tampão fosfato de potássio (KPi) 0,1M, pH 7,0 contendo EDTA 1mM.

4.5.2 Atividade enzimática da glutatona redutase (GR), tioredoxina redutase (TrxR) e glutatona-S-transferase (GST)

Foram pesados 50 mg de brânquia e glândula digestiva em microtubos aos quais foram adicionados 200 μL de HEPES 20mM pH 7, homogeneizados, centrifugados a 20.000 x g por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e guardados os sobrenadantes a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.3 Atividade enzimática da γ -glutamil transpeptidase (GGT)

Foram pesados 50 mg de brânquia e glândula digestiva em microtubos aos quais foram adicionados 200 µL de HEPES 20mM pH 7, homogeneizados e centrifugados a 1.000 x g por 5 min a 4 °C e guardado o sobrenadante a -20°C.

4.5.4 Níveis de peroxidação lipídica (TBARS)

Foram pesados 50 mg de brânquia e glândula digestiva em microtubos aos quais foram adicionados 450µL de TRIS/HCl 100mM pH 7,4, homogeneizados e centrifugados a 1.000 x g por 10 min e guardado o sobrenadante a -20°C.

4.6 Análises Bioquímicas

Todos os ensaios bioquímicos foram analisados por espectrofotometria usando um espectrofotômetro Cary 50 ® UV /VIS da empresa Varian, conforme descritas a seguir.

4.6.1 Concentração de proteínas

A quantidade de proteínas foi medida segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976; ZOR; SELINGER, 1996) utilizando como proteína padrão a albumina de soro bovino. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino foi feita e a absorbância foi medida em 595nm e 450nm, sendo como valor final a ser utilizado a razão 595/450 nm.

4.6.2 Níveis de glutathiona total (GSH-t)

Para determinar os níveis de glutathiona total (GSH-t) foi empregada uma versão modificada do método enzimático de Tietze (AKERBOOM; SIES, 1981). O ensaio foi realizado em KPi 100 mM contendo 1 mM de EDTA, 0,225 mM de NADPH, 0,1 mM de DTNB (5,5'-ditiobis- [ácido 2-nitrobenzóico]) e GR 0,2 U/ml.

4.6.3 Atividade enzimática da glutathiona reductase (GR)

A atividade da GR foi medida através do consumo de NADPH pela enzima na redução da GSSG, o qual pode ser acompanhado em 340nm (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). O ensaio enzimático foi feito durante 5 minutos em um meio de reação com KPi 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH. O substrato iniciador da reação foi 1 mM GSSG. Como o NADPH também pode ser utilizado em outras reações inespecíficas, uma leitura sem a presença do substrato iniciador foi feita para que esta reação basal possa ser descontada.

4.6.4 Atividade enzimática da glutathiona-S-transferase (GST)

A conjugação do CDNB com a GSH, catalisada pela enzima GST, produz um composto que pode ser detectado em 340 nm, sendo a formação deste composto proporcional à atividade enzimática dessa enzima (HABIG; JAKOBY, 1981). O ensaio enzimático foi feito

durante 5 minutos em um meio de reação contendo KPi 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 e 1 mM GSH. O substrato iniciador da reação foi 1 mM de CDNB. O meio de reação, por conter GSH, reage espontaneamente com substrato iniciador, e por isso foi feita uma leitura sem a presença das amostras para descontar essa reação inicial.

4.6.5 Atividade enzimática da tioredoxina redutase (TrxR)

A atividade TrxR foi medida através da redução do DTNB, na presença de NADPH, detectada em 412 nm (HOLMGREN; BJORSNSTEDT, 1995). O ensaio enzimático foi feito durante 5 minutos com um meio de reação contendo 0,1 M de KPi pH 7,0, 10 mM de EDTA, 5 mM de DTNB e 0,2 mg/mL de BSA. O substrato iniciador foi NADPH 10 μ M. Uma leitura sem a presença do substrato iniciador foi feita para averiguar a atividade basal da reação do DTNB com outros tióis celulares na ausência de NADPH.

4.6.6 Atividade enzimática da γ -glutamil transpeptidase (GGT)

O substrato γ -glutamil-p-nitroanilida é clivado através da atividade da GGT para formar p-nitroanilina (SILBER; GANDOLFI; BRENDEL, 1986). O ensaio enzimático foi feito durante 5 minutos em um meio contendo tampão 38 mM de Tris/glicilglicina e 0,4 mM de γ -glutamil-p-nitroanilida. A taxa de liberação de p-nitroanilida foi medida espectrofotometricamente a 405 nm.

4.6.7 Níveis de produtos finais da peroxidação lipídica (TBARS)

Os níveis de produtos finais da lipoperoxidação (principalmente malondialdeído) foram medidos através de uma versão modificada do método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (DRAPER; HADLEY, 1990). Foram preparados, em tubos de vidro próprios para o ensaio, uma solução contendo 200 μ L de SDS 8,1%, 500 μ L de tampão ácido acético 1,3 M/HCl, 0,27 M, pH 3,4 e 500 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6%. Foi adicionado até 300 μ L de amostra à esta solução e incubada por 30 minutos a 95 °C. A reação produzida pelo malondialdeído (produto final da peroxidação lipídica) e o TBA produz um cromóforo medido fotometricamente a 532 nm.

4.7 Toxicidade aguda do CDNB 10 μ M

A fim de averiguar se o CDNB poderia causar mortalidade para ostras *C. gigas* após possíveis distúrbios no sistema antioxidante, ostras foram expostas a CDNB 10 μ M por 24 horas e a taxa de mortalidade foi acompanhada por 72 h após a exposição, sendo os animais mantidos apenas em água do mar a qual foi trocada a cada 24 h. Neste delineamento, foi observado se os distúrbios iniciais causados em 24 h pelo CDNB no sistema antioxidante poderiam levar à letalidade mesmo após o término da exposição ao agente eletrofílico.

Além disso, um segundo grupo de animais foi exposto de maneira contínua (sistema semi-estático) a CDNB 10 μ M por 96 h a fim de melhor caracterizar a toxicidade deste composto para ostras *C. gigas*. A água do mar foi trocada a cada 24 h, seguido da adição de CDNB. Neste delineamento, foi observado se a exposição contínua a CDNB por 96 h poderia causar letalidade devido a distúrbios no sistema antioxidante de médio prazo. Em ambos os experimentos, cada grupo foi composto por 12 animais.

4.8 Análises Estatísticas

Tendo em vista que cada experimento foi realizado mais de uma vez, os dados obtidos para as análises bioquímicas foram normalizados em relação ao respectivo grupo controle (100%) para cada experimento. Esses valores relativos foram então analisados utilizando o software Statistica® e GraphPad Prism 5.0. Inicialmente, foi testada a normalidade dos dados de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, e estes foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Duncan ou pelo teste de Kruskal-Wallis quando necessário.

As análises de toxicidade aguda foram realizadas por análise de PROBIT pelo teste de Mantel-Cox. Diferenças entre os valores absolutos dos grupos controle para cada parâmetro bioquímico analisado em cada tecido foram analisadas pelo teste t de Student. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

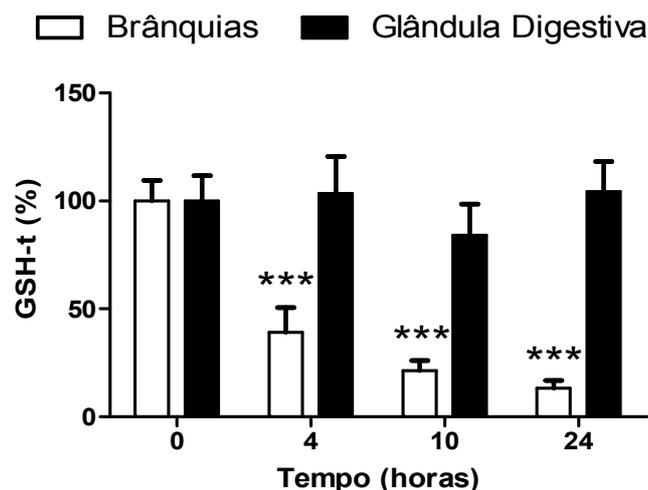
5.1 Exposição ao CDNB

A modulação do sistema antioxidante e de biotransformação de fase II foram avaliados na brânquia e glândula digestiva de ostras expostas a CDNB 10 μ M por 0, 4, 10 e 24 h. Os parâmetros analisados foram os níveis de GSH-t e de peroxidação lipídica (TBARS), a atividade das enzimas GR, TrxR, GST e GGT, além da avaliação da toxicidade aguda de CDNB em um modelo de depuração e de exposição prolongada.

5.1.1 Níveis de GSH-t

Tendo em vista que a GSH é utilizada na metabolização de compostos eletrofílicos como CDNB, seus níveis (GSH-t, a soma das formas GSH e GSSG) foram avaliados em ostras *C. gigas* expostas a este composto por 0, 4, 10 e 24 horas (Fig. 9). Foi observado um rápido consumo de GSH-t na brânquia, de aproximadamente 60 % após 4 horas, progredindo ao longo do tempo de exposição (~79% em 10 horas) e chegando a 87% de consumo ao final de 24 horas. A glândula digestiva não apresentou este mesmo padrão, mantendo valores semelhantes ao controle ao longo da exposição.

Figura 9. Níveis de glutatona total em brânquias e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas*, expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 μ M por 24 horas. Resultados expressos em % em relação ao controle e média \pm erro padrão médio. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan (n = 12). Diferenças estatísticas em relação ao respectivo grupo controle são apresentadas por *** ($p < 0,001$). Valores absolutos do grupo controle (0 h) estão demonstrados na Tabela 1.



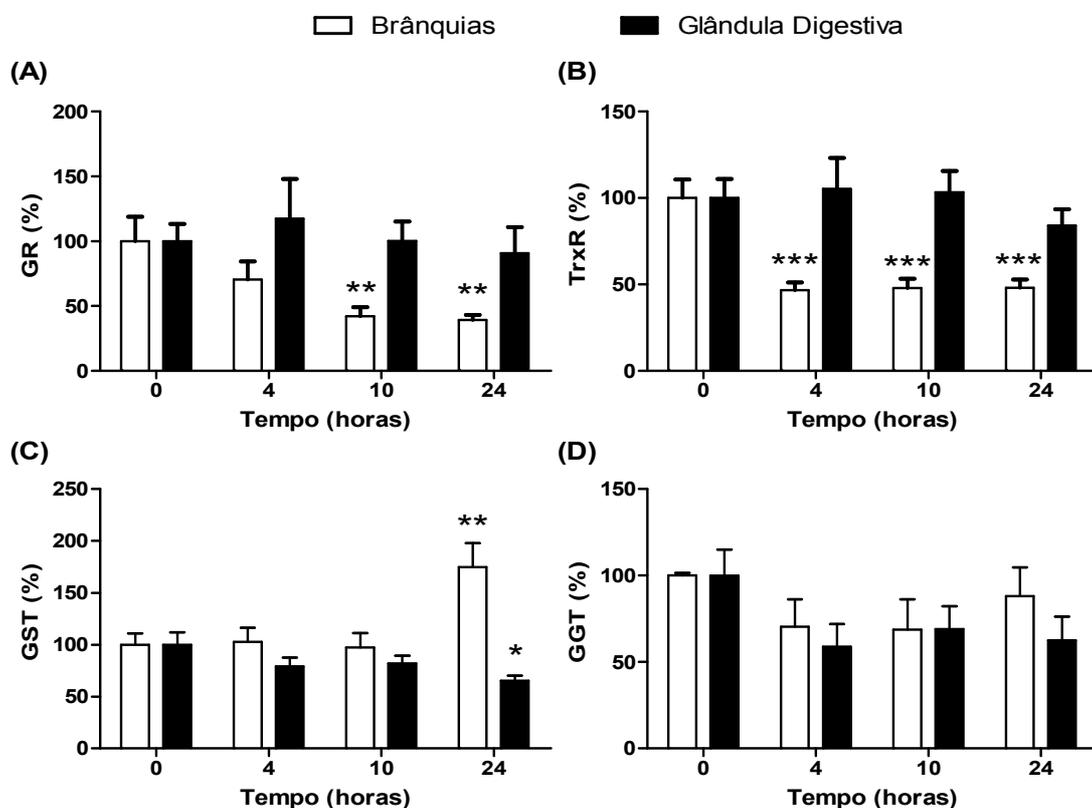
5.1.2 Atividade das enzimas antioxidantes

Uma vez que o CDNB é conhecido por inibir as enzimas antioxidantes GR e TrxR (TREVISAN et. Al, 2012, 2014; TIWARI et. Al, 2014), e ser substrato universal da GST (BIECZYNSKI et al., 2014), estas enzimas foram analisadas na brânquia e glândula digestiva

ao longo do período de exposição (Fig. 11). Na brânquia, a enzima GR (Fig.10A) foi inibida aproximadamente 60% após 10 e 24 horas, assim como a TrxR foi inibida aproximadamente 54% a partir de 4 h de exposição (Fig. 10B). Para a enzima GST, foi observado um aumento de 75% em sua atividade na brânquia após 24 h de exposição (Fig. 10C).

Para a glândula digestiva, apenas uma diminuição de 35% foi observada na atividade da GST após 24 h de exposição (Fig. 10C). Sabendo que os conjugados de glutathione são transportados para fora da célula para posterior metabolização da via do ácido mercaptúrico (Fig. 9), a atividade da GGT também foi analisada nestes dois tecidos em ostras expostas a CDNB, já que esta enzima atua na remoção do resíduo de γ -glutamil do conjugado DNPSG. A atividade da GGT (Fig. 10D) permaneceu inalterada tanto na brânquia como na glândula digestiva para todos os tempos de exposição analisados.

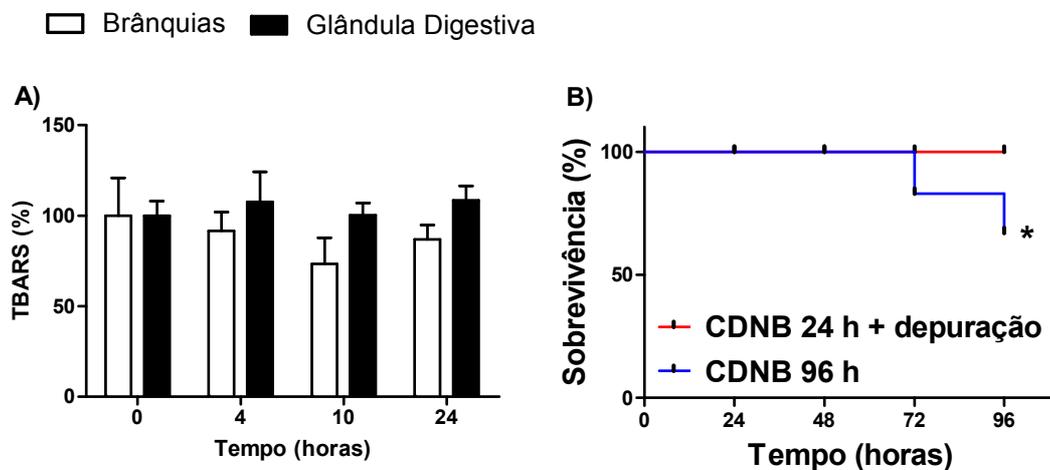
Figura 10. Atividades enzimáticas em brânquias e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas*, expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 μ M por 24 hrs. Em (A) glutathione redutase (GR), em (B) tioredoxina redutase (TrxR), em (C) glutathione-S-transferase (GST) e em (D) γ -glutamil transpeptidase (GGT). Resultados expressos em % em relação ao controle, média \pm erro padrão médio. As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan (GR na brânquia, TrxR em ambos os tecidos, GST na glândula digestiva) ou pelo teste de Kruskal Wallis (demais análises) (n = 12). Diferenças estatísticas em relação ao respectivo grupo controle são apresentadas por * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). Valores absolutos do grupo controle (0 h) estão demonstrados na Tabela 1.



5.1.3 Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e verificação da toxicidade do CDNB 10 μ M

A toxicidade do CDNB para ostras *C. gigas* foi investigada através da análise dos níveis de peroxidação lipídica e da taxa de mortalidade durante a exposição. Apesar dos distúrbios causados no sistema antioxidante pelo CDNB, não foram observadas alterações significativas nos níveis de lipoperoxidação em nenhum dos tecidos ao longo da exposição (Fig. 11A). No ensaio de toxicidade aguda (Fig. 11B), não foi observada mortalidade nos controles ou nos animais expostos a CDNB por 24 h seguida de depuração por 72 h. Entretanto, foi observada a indução da mortalidade na exposição contínua a CDNB por 96 h: 17% após 72 h e 33% após 96 h.

Figura 11. Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e verificação da toxicidade do CDNB 10 μ M. Em (A) níveis de TBARS (n = 12) em brânquias e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas*, expostas a 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 μ M por 24 hrs. Em (B) sobrevivência (n = 12) de ostras *C. gigas* expostas a CDNB 10 μ M por 24 horas seguido de depuração por 72 h ou expostas a CDNB por 96 horas. Valores absolutos do grupo controle (0 h) estão demonstrados na Tabela 1. As análises estatísticas para os níveis de TBARS foram realizadas através de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan, enquanto as análises de sobrevivência foram realizadas por análise de PROBIT e teste de Mantel-Cox. Diferença estatísticas entre os grupos na verificação de toxicidade do CDNB está apresentada por * (p < 0,05).



5.1.4 Comparação entre os níveis de parâmetros relacionados ao sistema antioxidante e de biotransformação em brânquia e glândula digestiva

Os valores absolutos dos parâmetros bioquímicos analisados nas brânquias e glândula digestiva estão sumarizados na Tabela 1. Os níveis de GSH-t na glândula digestiva foram maiores do que nas brânquias (~ 2 vezes), assim como os valores de GR (~ 3 vezes) e GGT (~ 15 vezes). Por outro lado, os valores de TrxR e GST foram maiores nas brânquias, aproximadamente 2 e 1,5 vezes, respectivamente. Apenas os valores de TBARS não mostraram diferenças entre os tecidos analisados.

Tabela 1. Valores absolutos dos parâmetros bioquímicos analisados na brânquia e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* do grupo controle (0 horas). Glutationa total – GSH-t; Glutationa redutase – GR; Tio redoxina redutase – TrxR; Glutationa-S-transferase – GST; γ -glutamil transpeptidase – GGT; Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico – TBARS

	GSH-t ^a	GR ^b	TrxR ^b	GST ^b	GGT ^b	TBARS ^c
Brânquias	0,44 ± 0,15	5,5 ± 3,4	8,0 ± 3,0	120,0 ± 44,5	12,7 ± 1,9	8,5 ± 4,3
Glândula Digestiva	0,79** ± 0,34	14,9*** ± 6,6	3,7*** ± 1,5	76,5* ± 31,7	192,0*** ± 70,6	9,8 ± 1,9

Valores obtidos na glândula digestiva foram comparados com a brânquia através do teste T (n = 12). Diferenças estatísticas entre os tecidos são apresentadas por * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001).

^a μ mol/g peso úmido;

^b nmol/min/mg de proteína;

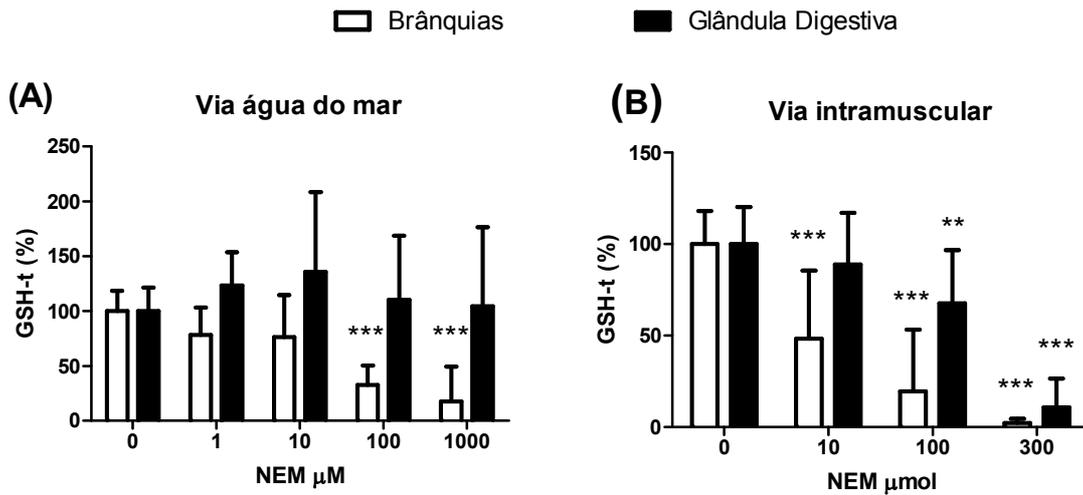
^c μ mol /mg de proteína

5.2 Exposição a NEM

Tendo em vista o rápido e intenso consumo de GSH na brânquia durante a exposição a CDNB, um segundo conjunto de experimentos utilizou outro composto eletrofilico (NEM) para investigar o papel da GSH na brânquia de ostras *C. gigas*. Foram avaliados os níveis de GSH-t na brânquia e glândula digestiva em ostras expostas a NEM via água do mar ou intramuscular (Fig. 12). Este experimento visou estimar a entrada deste composto em ambos os tecidos.

Conforme o esperado, os resultados da exposição ambiental (via água do mar) (Fig. 12A) foram semelhantes aos encontrados para o CDNB, ocorrendo diminuição de GSH-t apenas na brânquia: aproximadamente 70 % para a concentração de 100 μ M, sendo esta ainda mais expressiva com aumento da concentração de NEM para 1000 μ M (~ 80%). Já na exposição via intramuscular (Fig. 12B) houve diminuição de maneira dose-dependente nas brânquias já a partir de 10 μ mol (~ 52%), chegando à máxima diminuição em 300 μ mol (~ 98%). Porém, neste tipo de exposição também foi verificada a diminuição nos níveis de GSH-t na glândula digestiva nos grupos de maior concentração: 100 μ mol e 300 μ mol, aproximadamente 33% e 90%, respectivamente.

Figura 12. Níveis de glutathiona total em brânquias e glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas*, expostas in vivo a n-etilmaleimida (NEM) por 1 hora. Em (A) ostras foram expostas através da adição de NEM à água do mar (n= 6) (0 μ M – controle, 1, 10, 100 e 1000 μ M). Em (B) ostras foram expostas através da injeção de NEM no músculo adutor (n= 8) (0 μ mol – controle, injeção de água do mar; NEM 10, 100 e 300 μ mol). Resultados expressos em % em relação ao controle, média \pm erro padrão médio. As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Duncan (glândula digestiva na exposição via água do mar) ou pelo teste de Kruskal Wallis (demais análises). Diferenças estatísticas em relação ao respectivo grupo controle são representadas por ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001).



6. DISCUSSÃO

Apesar de possuírem um papel protetor contra eventos oxidativos, as defesas antioxidantes podem atuar de maneiras distintas nos diferentes grupos animais, órgãos e tecidos (CLARKSON; THOMPSON, 2000; SHAHIDUL ISLAM; TANAKA, 2004; GIRÓN-PÉREZ et al., 2013), tendo em vista às inúmeras diferenças biológicas existentes entre os seres vivos.

A fim de melhor caracterizar as respostas antioxidantes de ostras *C. gigas* decorrentes do estresse oxidativo que pode ser gerado na presença de compostos eletrofílicos, assim como procurar compreender a contribuição de diferentes tecidos (brânquias e glândula digestiva) nestas respostas, este trabalho utilizou como modelo o composto eletrofílico sintético CDNB, conhecido por sua capacidade de promover distúrbios no sistema antioxidante em diferentes organismos (HARLAN et al., 1984; SEYFRIED; WÜLLNER, 2007; TREVISAN et al., 2012, 2014; TIWARI et al., 2014).

O CDNB causou um rápido e acentuado consumo de GSH-t nas brânquias a partir de 4 h de exposição, chegando a expressivos 87% de consumo ao fim do experimento. Esse consumo de GSH já era esperado, levando-se em consideração o seu papel na conjugação do composto através da GST (Fig. 8 e 9), como já havia sido demonstrado em trabalhos com o uso de CDNB *in vitro*, com células de bovinos, células endoteliais humanas (HARLAN et al., 1984) e hemócitos de ostras *C. gigas* (MELLO et al., 2015), assim como *in vivo* com nemátodos (TIWARI et al., 2014) e bivalves (TREVISAN et al., 2012; TREVISAN et al., 2014).

A conjugação de compostos eletrofílicos com GSH via GST é um dos principais mecanismos de detoxificação desses compostos (SHEEHAN et al., 2001). Derivado da conjugação entre CDNB e GSH mediada pela GST, há a formação do composto DNP-SG, (BOYLAND; CHASSEAUD, 1969). O consumo de GSH-t ao longo do tempo de exposição na brânquia corrobora a ideia de absorção de CDNB seguido de sua conjugação com GSH, sendo de se esperar que o processo de absorção e conjugação de GSH seja rápido e robusto na brânquia.

O aumento na atividade da GST nas brânquias está de acordo com o consumo de GSH-t neste tecido. Este padrão de indução de GST é uma resposta amplamente detectada em organismos aquáticos expostos *in situ* a contaminantes ambientais, por exemplo: brânquias e glândulas de mexilhões nativos *P. viridis* expostos a locais com alta incidência de poluição por metais pesados e petróleo na Índia (JENA; VERLECAR; CHAINY, 2009) e na glândula

digestiva de mexilhões *Mytella guyanensis* em manguezais sob influência antrópica em Florianópolis-SC (TORRES et al., 2002).

Esse aumento na atividade da GST na brânquia sugere uma eficiente indução da transcrição gênica da GST nas primeiras horas de exposição. Os níveis de diversas isoformas de GST é bem documentada em mamíferos em relação à exposição a agentes eletrofílicos, incluindo fármacos (SATO; MCKERCHER; LIPTON, 2013), compostos naturais de plantas (HASEGAWA et al., 2010), poluentes atmosféricos (LI et al., 2004) e pesticidas (MEDINA-DIAZ et al., 2011) assim como em células cancerígenas (IKEDA; NISHI; SAKAI, 2004). Esta resposta está vinculada a ativação do fator de transcrição Nrf2 (do inglês *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), o qual pode ser ativado por compostos eletrofílicos e induzir a transcrição de genes relacionados a biotransformação de fase II, como a GST (ZHANG; FORMAN, 2010; NERLAND, 2007).

A indução da atividade de GST devido à exposição ao CDNB já foi verificada no fígado de peixes (HENSON; STAUFFER; GALLAGHER et al., 2001), assim como síntese de GSH concomitante com o aumento na atividade da GST em *C. gigas* expostas a algas produtoras de ficotoxinas (GARCÍA-LAGUNAS; ROMERO-GERALDO; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, 2013). Entretanto, o papel da via do Nrf2 ainda não foi abordado em bivalves, impossibilitando uma maior compreensão desse padrão de indução gênica.

No presente trabalho, foram observados na glândula digestiva níveis constantes de GSH-t e uma menor atividade da GST após 24 h. Este dado sugere uma eficiente metabolização inicial pelas brânquias e conseqüentemente baixa entrada e acúmulo de CDNB na glândula digestiva. Além disso, a menor atividade GST neste tecido após 24 h de exposição a CDNB pode ser decorrente a um bloqueio temporário na transcrição de genes de isoformas de GST neste tecido, o qual necessita ser investigado com maiores detalhes a fim de melhor compreender a eficiência do sistema da GST e GSH neste tecido.

Os conjugados de GSH originados a partir da ação da GST devem ser transportados para fora da célula, sendo reconhecidos por transportadores específicos do tipo ABC (do inglês *ATP binding cassette*), como o transportador de ânions orgânicos multiespecíficos e transportador de adutos glutatona-dinitrofenóis (DNP-SG ATPase) e conduzidos para o meio extracelular (SHEEHAN et al., 2001; UBER et al., 2008). Conjugação de compostos eletrofílicos com GSH via GST, seguido de seu transporte para posterior metabolização ou excreção, já é bem caracterizado em modelos de estudo com mamíferos (STOELTING; TJEERDEMA, 2000; VAIDYA; GERK, 2007), porém em bivalves ainda é pouco estudado.

O presente trabalho aponta para evidentes eventos de biotransformação de fase II em ostras *C. gigas* expostas a CDNB. Os dados ainda são inconclusivos a respeito do papel da brânquia e da glândula digestiva em eventos de conjugação de eletrofilicos, apesar de apontar para a brânquia como um potencial tecido na detoxificação destes compostos. Interessantemente, a glândula digestiva possui elevados níveis de GSH-t e atividade da GGT (Tabela 1) quando comparado com a brânquia, moléculas chave para a via do ácido mercaptúrico, porém não foi observada uma evidente modulação desta via neste tecido. Estudos complementares do nosso grupo estão em andamento com este modelo experimental para investigar o metabolismo de conjugados de glutathione (via do ácido mercaptúrico) na brânquia, glândula digestiva e hemolinfa, e sua importância como sistema de defesa em bivalves marinhos.

Tendo em vista que o CDNB é capaz de inibir enzimas do sistema antioxidante, estas foram analisadas como marcadores a fim de inferir a velocidade e intensidade da absorção de CDNB pela brânquia e glândula digestiva em ostras *C. gigas*. Foram detectadas inibições das enzimas GR e TrxR entre 4 e 24 h de exposição, porém apenas para a brânquia. Já é descrito que o CDNB e o DNP-SG podem atuar como inibidores da GR (BILZER et. al, 1984), podendo esta inibição ser crítica quando levado em consideração o importante papel da GR nos mecanismos de defesas antioxidantes, reforçando a importância do papel da GST para a eliminação deste composto.

Por exemplo, a inibição da GR utilizando o CDNB já havia sido demonstrada em células endoteliais humanas e de bovinos (HARLAN et al., 1984), onde foi denotado que neste cenário o H_2O_2 é capaz de induzir a lise de células endoteliais, uma vez que a ação da GPx pode ser prejudicada na ausência de uma eficiente atuação da GR (Fig. 4). Também é reconhecido que o CDNB é capaz de interagir com ambos os resíduos de cisteína e selenocisteína no sítio ativo da TrxR, os quais estão envolvidos na redução da ponte dissulfeto da Trx dependente de NADPH, (TIWARI et. Al, 2014). A inibição da TrxR pelo CDNB já foi relatada, por exemplo, em mamíferos (SEYFRIED; WÜLLNER, 2007) e nemátodos (TIWARI et. Al, 2014).

Provavelmente tanto o CDNB como o seu derivado, o DNP-SG, podem estar causando a inibição observada em ambas enzimas antioxidantes na brânquias de *C. gigas*. Tendo em vista que estas inibições foram detectadas a partir de 4 – 10 h de exposição a CDNB na brânquia, esses dados reforçam o padrão temporal de consumo de GSH-t por CDNB, indicando a rápida absorção deste composto pelo organismo possivelmente através deste tecido.

Apesar do claro distúrbio antioxidante causado pelo CDNB, com consumo de GSH-t e inibições de GR e TrxR nas brânquias, não foram detectados sinais de aumento de danos oxidativos, ao menos através da análise dos níveis de peroxidação lipídica. A fim de verificar esse panorama, os animais foram mantidos sob depuração em água do mar por adicionais 72 h para averiguar se esses distúrbios iniciais causados pelo CDNB em 24 h poderiam causar letalidade.

Concordante com a ausência de lipoperoxidação, a sobrevivência dos animais utilizando este protocolo foi de 100%, sugerindo que este distúrbio antioxidante é de menor relevância ou é rapidamente restaurado durante a depuração. Entretanto, animais expostos de maneira contínua ao CDNB apresentaram significativa mortalidade, possivelmente porque o CDNB pode afetar outros tecidos após 24 h de exposição (tendo em vista que o sistema de biotransformação da brânquia pode estar sobrecarregado pela depleção de GSH-t), aumentando o distúrbio antioxidante e sobrecarregando mecanismos de detoxificação ao longo do tempo.

De fato a exposição aguda ao CDNB (até 24 h), apesar de não ter causado mortalidade durante o período de depuração, já demonstrou ser capaz de aumentar a susceptibilidade a estresses posteriores em bivalves, como em ostras *C. gigas*, pré-tratadas com CDNB, seguida de exposição a menadiona (TREVISAN et al., 2012) e em mexilhões *P. perna*, pré-tratados com CDNB, seguida de exposição a peróxidos (TREVISAN et al., 2014). Além disso, inibição da GR pela carmustina, substância ativa de um medicamento antineoplásico, em células neurais de roedores também diminuiu a resistência contra exposição a agentes oxidantes (MITOZO et al., 2011), denotando como distúrbios no sistema antioxidante são importantes em situações de estresses múltiplos em diferentes modelos biológicos.

Conforme já discutido anteriormente, a brânquia se mostrou como um tecido mais sensível à exposição de CDNB quando comparado com a glândula digestiva. Usualmente, bivalves podem absorver substâncias químicas através das brânquias e as distribuem via hemolinfa para os demais órgãos (LIU et al., 2014), uma vez que este tecido se encontra em contato direto com o ambiente aquático. Essa proteção inicial propiciada pelas brânquias se deve, possivelmente, ao fato deste tecido ser a principal fonte de entrada do CDNB nos animais, sendo também uma barreira que neutraliza ou, pelo menos, minimiza seus efeitos.

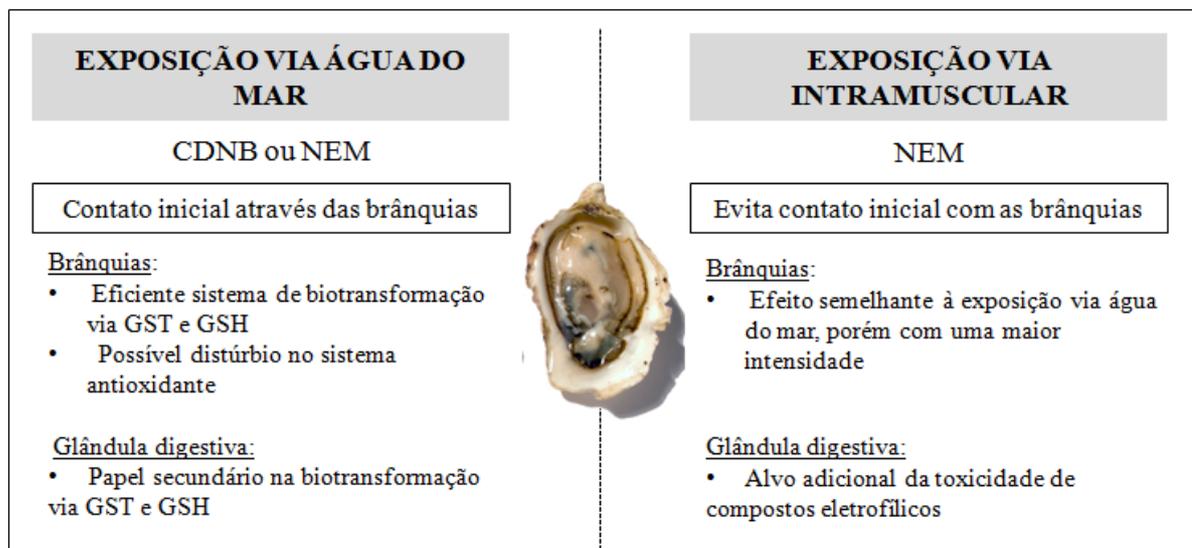
Dessa forma, é possível que este tecido atue como uma importante barreira na metabolização de substâncias eletrofilicas presentes na água do mar, aliado a uma alta capacidade de biotransformação mediado pelo sistema da GSH e GST.

Levando esse ponto em consideração, um experimento adicional foi realizado para avaliar e comparar o papel da GSH na neutralização de agentes eletrofílicos na brânquia e glândula digestiva utilizando o composto eletrofílico NEM. Esta substância possui alta reatividade com tióis, alta solubilidade em água e atravessa facilmente membranas biológicas (GIBON et al., 2010), dessa forma a quantificação dos níveis de GSH-t pode ser utilizada para estimar a entrada deste composto nos tecidos.

A exposição foi feita de duas maneiras: ambiental (via água do mar) e sistêmica (via injeção intramuscular), sendo esta última como forma de tentar evitar o contato inicial da NEM com as brânquias. Exposição via água do mar mostrou resultados semelhantes aos encontrados para o CDNB, ocorrendo diminuição somente nas brânquias.. Por outro lado, na exposição de NEM via intramuscular, junto com a expressiva depleção de GSH nas brânquias, também levou a diminuição dos níveis de GSH-t na glândula digestiva, porém em menor grau. Este dado contrasta com os efeitos de exposição ao CDNB e NEM via água do mar, onde foram verificados somente efeitos nas brânquias.

Dessa forma, em ambos os modelos experimentais utilizando a água do mar como via de exposição, foi possível inferir que a brânquia pode atuar como uma barreira inicial com compostos eletrofílicos presentes na água do mar, acoplando esta absorção a um competente sistema de conjugação mediado pela GSH e GST (Figura 13).

Figura 13. Representação gráfica das formas de exposição e das principais conclusões deste trabalho.



7. CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho apontam para a brânquia como um tecido sensível a agentes eletrofilicos dissolvidos na água do mar levando a uma rápida conjugação desses compostos com GSH conforme evidenciado pelo forte consumo de GSH nas primeiras horas de exposição.

A brânquia pode atuar como uma primeira barreira metabólica contra estes compostos através do sistema da GST e GSH, diminuindo a entrada destas substâncias para outros tecidos e possivelmente diminuindo sua toxicidade para o organismo. Entretanto, não é claro se no caso de exposições prolongadas a estes compostos, ou através de vias associadas ao sistema digestório (*e.g.* através da ingestão de microalgas contaminadas), a brânquia manteria seu papel de barreira inicial ou se poderia atuar de maneira secundária no metabolismo de substâncias eletrofilicas.

A glândula digestiva se apresentou como um tecido com menor atuação na biotransformação aguda de compostos eletrofilicos dissolvidos na água do mar. Possivelmente, isso se deve ao fato de uma menor entrada destes compostos neste tecido. Apesar de a glândula digestiva possuir uma alta capacidade de biotransformação, a via de exposição é crucial para determinar sua atuação em diferentes etapas de detoxificação de xenobióticos.

8. REFERÊNCIAS

- AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v.77, p.373-382. 1981.
- BARBOSA, K. B. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BENNETT, B.; KIMBALL, E.; GAO, M. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 8, p. 593–599, 2009.
- BIECZYNSKI, F. et al. Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. **Aquatic toxicology**, v. 154, p. 97–106, 2014.
- BILZER, M. et al. Interaction of a glutathione S-conjugate with glutathione reductase. Kinetic and X-ray crystallographic studies. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 138, n. 2, p. 373–8, 1984.
- BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L. F. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 32, p.173–219, 1969.
- BRADFORD, M. M. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding.” **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods in Enzymology**, v.113, p.484-490, 1985.
- CATTERALL, F.; KING, L. J.; IOANNIDES, C. Mutagenic activity of the glutathione S-transferase substrate 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) in the Salmonella mutagenicity assay. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 520, p. 119–124, 2002.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2.a Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 466p, 1997.
- CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants : what role do they play in physical activity and health ? 1, 2. v. 72, 2000.
- COUCEIRO, S. R. M. et al. Effects of an oil spill and discharge of domestic sewage on the insect fauna of Cururu stream, Manaus, AM, Brazil. **Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia**, v. 66, n. 1A, p. 35–44, 2006.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.186, p.421-431. 1990.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). **Cultivo de moluscos**. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=657> Acesso em: 23/04/2015.

FAO, 2015 (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) – **Recursos Perqueiros: Espécies de cultura – *Crassostrea gigas***. Disponível em <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en> (acessado em 18/10/2015).

FATMA, FUNDAÇÃO DE AMPARO AO MEIO AMBIENTE: SC. **Balneabilidade do Litoral Catarinense: Histórico de Balneabilidade Praia do Ribeirão da Ilha**. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/laboratorio/relatorio_ficha2.php?simplificado=1&where=0&d1=2014-01-01&d2=2014-12-31&mc=2&pc=81> . Acesso em 18/10/2015).

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v. 205, n. 3, p. 223–40, 2004.

FREITAS, C. M.; PORTO, M. F. S. **Saúde, Ambiente e Sustentabilidade**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2006.

GARCÍA-LAGUNAS, N.; ROMERO-GERALDO, R.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N. Y. Genomics Study of the Exposure Effect of *Gymnodinium catenatum*, a Paralyzing Toxin Producer, on *Crassostrea gigas*' Defense System and Detoxification Genes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

GIBON, J et. Al. The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn(2+) but not of Ca(2+) in murine cortical neurons. **Cell Calcium**, v. 48, n. 1, p. 37–43, 2010.

GIRÓN-PÉREZ, M. et al. Evaluation of pollution in Camichin estuary (Mexico): pro-oxidant and antioxidant response in oyster (*Crassostrea corteziensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 165, n. 4, p. 476–82, 2013.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods in Enzymology**, v.77, p.218-31, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 851p, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–55, 2004.

HAMILTON, D. S. et al. Mechanism of the Glutathione Transferase-Catalyzed Conversion of Antitumor 2-Crotonyloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH Adducts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 5, p. 15049–15058, 2003.

HARLAN, J. M. et al. Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 3, p. 706–713, 1984.

HASEGAWA, K. et al. Allyl Isothiocyanate that Induces GST and UGT Expression Confers Oxidative Stress Resistance on *C. elegans*, as Demonstrated by Nematode Biosensor. **PLoS ONE**, v. 5, p. e9267, 2010.

HOLMGREN, A.; BJORSNSTEDT, T. M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods Enzymol.**, vol. 252, p. 199-208, 1995.

HENSON, K. L.; STAUFFER, G.; GALLAGHER, E. P. Induction of glutathione S-transferase activity and protein expression in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) liver by ethoxyquin. **Toxicological Sciences**, v. 62, n.1, p. 54–60, 2001.

HINCHMAN, C. A.; BALLATORI, N. Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 41, n. 4, p. 387– 409, 1994.

HONG, S. et al. Species- and tissue-specific bioaccumulation of arsenicals in various aquatic organisms from a highly industrialized area in the Pohang City, Korea. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 192, p. 27–35, 2014.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1179-1179 2008.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000, 2008**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/pnsb.pdf>> (2000), <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/PNSB_2008.pdf> (2008). Acesso em 18/10/2015).

IKEDA, H.; NISHI, S.; SAKAI, M. Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. **The Biochemical journal**, v. 380, n. 2, p. 515–521, 2004.

JENA, K. B.; VERLECAR, X. N.; CHAINY, G. B. N. Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 107–113, 2009.

JIMENEZ, R. S.; DAL BOSCO, S. M.; CARVALHO, W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolecita – influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 734–738, 2004.

KIM, B.-M et al. Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (hsp) modulation in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 166, p. 65–74, 2014.

- LI, N. et al. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 3467–3481, 2004.
- LIU, D. et al. A physiologically based toxicokinetic and toxicodynamic model links the tissue distribution of benzo[a]pyrene and toxic effects in the scallop *Chlamys farreri*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 493–504, 2014.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011.
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 1-2, p. 75–88, fev. 2005.
- MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. **Biological Markers of Environmental**. Boca Raton: Lewis Publishers. p. 3-16, 1990.
- MEDINA-DÍAZ, I. M. et al. Organophosphate pesticides increase the expression of alpha glutathione S-transferase in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2074–2079, 2011.
- MELLO, D. F. et al. How important are glutathione and thiol reductases to oyster hemocyte function? **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 2, p. 566-572, out. 2015.
- MITOZO, P. A. et al. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 69–77, 2011.
- MOORE, M. N. et al. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation research**, v. 552, n. 1-2, p. 247–68, 18 ago. 2004.
- NERLAND, D. E. The Antioxidant/electrophile response element motif. **Drug Metabolism Reviews**, v. 39, n. 1, p. 235–248, 2007.
- POSTIGO, C.; BARCELÓ, D. Synthetic organic compounds and their transformation products in groundwater: Occurrence, fate and mitigation. **The Science of the Total Environment**, vol. 503-504, p. 32-47, 2014.
- REGOLI, F. et al. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 167–178, 2004.
- RITTSCHOF, D.; MCCLELAN-GREEN, P. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p.369-373, 2005.

- RUDNEVA, I. I.; KUZMINOVA, N. S.; SKURATOVSKAYA, E. N. Glutathione-S-Transferase Activity in Tissues of Black Sea Fish Species. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 141–150, 2010.
- SARMENTO, M.; DURÃO, D.; DUARTE, M. Study of environmental sustainability: The case of Portuguese polluting industries. **Energy**, v. 30, n. 8 SPEC. ISS., p. 1247–1257, 2005.
- SATOH, T.; MCKERCHER, S. R.; LIPTON, S. A. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. **Free radical biology & medicine**, v. 65, p. 645–57, 2013.
- SEYFRIED, J.; WÜLLNER, U. Inhibition of Thioredoxin reductase induces apoptosis in neuronal cell lines: Role of glutathione and the MKK4/JNK pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 359, n. 3, p. 759–764, 2007.
- SHAHIDUL ISLAM, M.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 7-8, p. 624–49, 2004.
- SHARMA, S.; SULTANA, S. Modulatory effect of soy isoflavones on biochemical alterations mediated by TPA in mouse skin model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1669–1675, 2004.
- SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Society**, v. 16, p. 1–16, 2001.
- SILBER, P. M.; GANDOLFI, A. J.; BRENDEL, K. Adaptation of a γ -glutamyl transpeptidase assay to microtiter plates. **Analytical Biochemistry**, v. 158, n. 1, p. 68–71, 1986.
- STOELTING, M. S.; TJEERDEMA, R. S. Glutathione-dependent biotransformation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in arterial and venous blood of the striped bass (*Morone saxatilis*). **Aquatic Toxicology**, v. 50, n. 3, p. 177–187, 2000.
- TIWARI, S. et al. Inhibition of thioredoxin reductase by CDNB induces apoptosis in filarial parasite *Setaria cervi*: A proteomic and biochemical approach. **Journal of Proteomics**, 2014.
- TORRES, A. M. et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 9, p. 923–932, 2002.
- TREVISAN, R. et al. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 108, p. 85–93, 2012.
- TREVISAN, R. et al. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. **Marine environmental research**, v. 101C, p. 81–90, 2014.
- TROVÃO, R. H.; CARREIRA, R. S. Hidrocarbonetos Alifáticos em sedimentos superficiais da enseada do Flamengo, Baía de Guanabara–RJ. **Geochimica brasiliensis**, v. 23, n. 2, p. 193–202, jan. 2009.

VAIDYA, S. S.; GERK, P. M. Simultaneous determination of 1-chloro- 2,4 dinitrobenzene, 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione and its metabolites for human placental disposition studies by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 859, n. 1, p. 94–102, 2007.

VAN BLADEREN, P. J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 61–76, 2000.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation**. Environmental Health Criteria. Geneva: World Health Organization, v.222, 238 p, 2001.

WINSTON, G. W.; GIULIO, R. T. DI. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, vol. 19, p 137-161, 1991.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J. Reexamination of the electrophile response element sequences and context reveals a lack of consensus in gene function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1799, n. 7, p. 496–501, 2010.

ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity : Theoretical and Experimental Studies. **Analytical Biochemistry**, v. 236, n. 0171, p. 302–308, 1996.

