

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Rafael Trevisan

**DEFESAS CELULARES E SISTEMA ANTIOXIDANTE EM
BIVALVES MARINHOS (*MYTILUS EDULIS* E *PERNA PERNA*)
EXPOSTOS A METAIS**

Dissertação submetido ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de mestre em Bioquímica em 15/07/2010.
Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre.
Co-orientador: Prof. Dr. John Moody.

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

T814d Trevisan, Rafael

Defesas celulares e sistema antioxidante em bivalves marinhos (*Mytilus Edulis* e *Perna Perna*) expostos a metais [dissertação] / Rafael Trevisan ; orientador, Alcir Luiz Dafre. - Florianópolis, SC, 2010.

92 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Selênio. 3. Cobre. 4. Bivalve.
5. *Mytilus*. 6. Glutathiona. 7. Estresse Oxidativo. I. Dafre, Alcir Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que ajudaram na realização deste trabalho e que me acompanharam durante o período do mestrado em Bioquímica

Ao professor Alcir Luiz Dafre, pela orientação e pela amizade durante a graduação e mestrado, me oferecendo as condições e o incentivo para a confecção deste trabalho.

Ao professor John Moody, pela orientação durante o estágio na Universidade de Plymouth (Inglaterra), permitindo que eu realizasse este projeto e aprendesse novas técnicas.

Aos colegas de trabalho no Laboratório de Defesas Celulares, Marcela, Samira, Péricles, Luiz, Anderson, Mariana, Bettina, Ariana, tanto pela ajuda nos trabalhos e experimentos, como nas conversas, descontrações e festas.

Aos colegas de pós-graduação Jacó, Marília e Karim, pela ajuda em experimentos, aprendizagem de novas técnicas.

À minha mãe e meu irmão, por me ajudarem durante esse tempo, e sempre me darem apoio pela escolha profissional que eu tive.

À Dani, pela amizade, companheirismo e paciência, principalmente nas longas conversas de bioquímica e biologia celulares.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado quando precisei, e tornaram esse período de estudo mais fácil e divertido.

Aos apoios financeiros que permitiram a realização deste trabalho: CAPES, CNPq, FAPESC.

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (ERO), metabólitos secundários do metabolismo do oxigênio, são moléculas geradas e reguladas constantemente pela célula. O aumento na sua produção pode levar a inúmeros processos patológicos, e para evitar esses efeitos tóxicos das ERO a célula conta com um complexo sistema de defesas celulares, incluindo defesas antioxidantes. Esse sistema é bem estudado e caracterizado em eucariotos mais complexos, como os mamíferos, e em eucariotos mais simples, como as leveduras, mas ainda pouco se sabe sobre esse sistema e sua regulação em invertebrados marinhos. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo estudar o sistema antioxidante de bivalves marinhos em situação de estresse oxidativo, e propor possíveis mecanismos de modulação e regulação redox nesses modelos animais. O trabalho foi dividido em dois experimentos: no primeiro, mexilhões azuis *Mytilus edulis* foram pré-expostos ao selênio (4µg/L) por 3 dias, e subsequentemente expostos por mais 3 dias a cobre (56 µg/L). Neste experimento, objetivamos detectar se os efeitos oxidativos do cobre podem ser atenuados pela pré-exposição ao selênio. Vários parâmetros antioxidantes e de dano celular foram avaliados. Nesta primeira etapa, observou-se que o cobre causa oxidação de tióis protéicos (PSH) e inibição da enzima tioredoxina redutase (TrxR) na brânquia e induz danos no DNA em hemócitos. O selênio aumenta a atividade da enzima glutathiona peroxidase dependente de selênio (GPx-Se) e os níveis de glutathiona (GSH). Quando os animais são pré-expostos a selênio e expostos em seguida ao cobre, a pré-exposição ao selênio é capaz de neutralizar os efeitos deletérios desse metal, revertendo a oxidação dos PSH, evitando a indução de danos no DNA e revertendo parcialmente a inibição da TrxR. No segundo experimento, mexilhões *Perna perna* foram expostos por até 21 dias ao zinco (10 µM), um metal conhecido por afetar o metabolismo da glutathiona. A exposição aguda (2 dias) ao zinco causou consumo de GSH e inibição da GR, porém estes valores retornam aos níveis basais após 7 e 21 dias de exposição. Os animais expostos por 7 e 21 dias ao zinco demonstram uma amplificação do sistema antioxidante, com aumento na atividade de diversas enzimas auxiliares (TrxR, GR) ou de detoxificação de ERO (catalase, glutathiona peroxidase total, superóxido dismutase). Apesar disso, essa amplificação não impediu um aumento nos níveis de peróxidos citosólicos e nos índices de peroxidação lipídica evidenciados após a exposição por 7 ou 21 dias. O conjunto de dados desses dois experimentos demonstram a importância do sistema antioxidante para

esses animais em situações de estresse oxidativo. O aumento dos níveis de GSH e da atividade da GPx-Se parecem ser uma importante via de proteção contra os danos oxidativos em mexilhões *M. edulis*, mediados pelo cobre. Já com relação ao zinco, o restabelecimento do metabolismo da glutathiona, o qual é afetado pelo zinco, é fundamental para as células branquiais de mexilhões *P. perna*, o qual responde ao insulto oxidativo com uma forte resposta adaptativa de amplificação das defesas antioxidantes celulares.

Palavras-chave: selênio, cobre, bivalves, *Perna perna*, *Mytilus edulis*, glutathiona, estresse oxidativo, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS), secondary metabolites of the oxygen metabolism, are molecules constantly generated and regulated by the cell. The increase in its production may lead to several pathological processes. To counterbalance the deleterious effects of ERO, cells are endowed with an elaborated cellular defense system, including antioxidant defenses. This system is well studied and characterized in complex eukaryotes, such as mammals, or simple eukaryotes, such as yeast, but little is known about either system or its regulation in marine invertebrates. The objective of the present work is to study the antioxidant system of marine bivalves that are under oxidative stress conditions, and propose mechanisms of its modulation. The study was separated in two experiments. In the first, blue mussels *Mytilus edulis* were exposed to copper (56 µg/L) during 3 days to observe the oxidative effects of this metal upon antioxidant and cell damage parameters. A group of animals was pre-exposed to selenium (3 days) and further exposed to copper for 3 additional days. This experiment has the objective of observing the possible interactions between the anti- and pro-oxidative effects of these compounds upon the cellular defenses of these animals. During the first part, it was observed that copper caused oxidation of protein thiols (PSH) and a decrease in the activity of thioredoxin reductase (TrxR) in gills and DNA damage in haemocytes. Selenium produced an increase in gills glutathione peroxidase selenium-dependent activity and glutathione (GSH) levels. When animals were pre-exposed to selenium and further exposed to copper, selenium was able to prevent the deleterious effects of copper, by avoiding PSH oxidation, DNA damage and partially restoring TrxR activity. In the second experiment, mussels *Perna perna* were exposed up to 21 days to zinc (10µM), a metal known by affecting the glutathione metabolism. Acute exposure (2 days) to zinc caused a consumption of GSH and a decrease in GR activity, but these values returned to normal levels after 7 or 21 days of exposure. Animals exposed to 7 and 21 days to zinc showed amplification in the antioxidant system, with increased activity of auxiliary (GR and TrxR) and ROS detoxification enzymes (catalase, total glutathione peroxidase and superoxide dismutase). Even so, this amplification could not prevent an increase in cytosolic peroxides and lipid peroxidation index at 7 or 21 days of exposure. Together, these data demonstrate the importance of the antioxidant system for these animals in oxidative stress situations.

The increase in GSH levels and GPx-Se activity seem to be an important protection mechanism against the oxidative damage in mussels *M. edulis*, and studies indicate that they may share the same regulation pathway. Regarding zinc, the reestablishment of glutathione metabolism, which is affected by zinc, is essential for the cell survival, and the further response to the oxidative insult was related to a coordinated amplification of several cellular antioxidant defenses.

Keywords: selenium, copper, bivalve, *Perna perna*, *Mytilus edulis*, glutathione, oxidative stress, glutathione peroxidase, glutathione reductase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O estado redox e o potencial de redução do oxigênio e seus derivados.	25
Figura 2: Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio na presença ou não de xenobiontes.	27
Figura 3: Reações envolvidas na peroxidação lipídica.....	29
Figura 4: Oxidação da cadeia polipeptídica de proteínas por espécies reativas de oxigênio.....	31
Figura 5: O mecanismo de formação de produtos de guanina a partir de reações de oxidação.	32
Figura 6: Estrutura química do tripeptídeo glutationa.....	33
Figura 7: Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	35
Figura 8: Mecanismo catalítico da catalase.....	37
Figura 9: Mecanismo de ação da glutationa peroxidase.....	37
Figura 10: Mecanismo catalítico da glutationa redutase (GR).....	38
Figura 11: Mecanismo catalítico de 2-Cys peroxiredoxina.....	41
Figura 12: Anatomia de um bivalve marinho da família Mytilidae.	49
Figura 13: Delineamento experimental do período de exposição. ..	51
Figura 14: Ilustração da análise de dano ao DNA no teste do cometa, através do software Komet 5.	58
Figura 15: Análises químicas na água e no tecido de mexilhões <i>Mytilus edulis</i>	61
Figura 16: Níveis tiólicos em brânquias de mexilhões <i>Mytilus edulis</i> após a exposição à Se e/ou Cu.....	62
Figura 17: Atividade de enzimas antioxidantes em brânquias de mexilhões <i>Mytilus edulis</i> após exposição a Se e/ou Cu.	63
Figura 18: Parâmetros na hemolinfa de mexilhões <i>Mytilus edulis</i> após a exposição a Se e/ou Cu.....	64
Figura 19: Níveis tiólicos em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a zinco por até 21 dias.	65
Figura 20: Atividades de enzimas antioxidantes em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos ao zinco por até 21 dias.	66
Figura 21: Atividades de enzimas antioxidantes em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a zinco por até 21 dias.	67

Figura 22: Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a zinco por até 21 dias.	68
Figura 23: Possível mecanismo de toxicidade do zinco em mexilhões <i>Perna perna</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Delineamento experimental do período de exposição	50
Tabela 2: Resumo dos efeitos antioxidantes do selênio e oxidativos do cobre em mexilhões <i>Mytilus edulis</i>	73
Tabela 3: Resumo dos efeitos do zinco em parâmetros antioxidantes de <i>Perna perna</i> após 2, 7 e 21 dias de exposição.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

·OH – Radical hidroxil
 $^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete
4-HNE - 4-hidroxinonal
AhR – Receptor hidrocarboneto aril
CAT – Catalase
Cu – Sulfato de cobre
DTNB – Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERA – Elementos de resposta antioxidantes
ERM - Elementos de resposta a metais
ERO – Espécies reativas de Oxigênio
G6PDH – Glicose 6-fosfato desidrogenase
GCL – Glutamato-cisteína ligase
GGT – γ glutamil transpeptidase
GPx – Glutaciona peroxidase
GPx-Se – Glutaciona peroxidase selênio dependente
GR – Glutaciona redutase
GS – Glutaciona sintetase
GSH – Glutaciona
GSH-t – Glutaciona total
GSSG – Disulfeto de glutaciona, ou glutaciona oxidada
GST – Glutaciona S-transferase
 H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
KPi – Tampão fosfato de potássio
MDA – Malondialdeído
MTF1 – Fator de transcrição dependente de metais
 NADP^+ - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NPSH – Tióis não protéicos
NRF2 - fator 2 relacionado ao NF-E2
 O_2^- - Ânion superóxido
PAH – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PBS – Tampão fosfato salina
PCA – Ácido perclórico
Prx – Peroxiredoxina
PSH – Tióis protéicos
ROH – Radical alcóxil

ROO[·] – Radical peroxil
ROOH – Peróxido lipídico
SDS – dodecil sulfato de sódio
Se – Selenito de sódio
SH – Grupamento tiol
SOD – Superóxido dismutase
TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRIS/HCl – Tampão tris(hidroximetil)aminometano
Trx – Tioredoxina
TrxR – Tioredoxina redutase
Zn – Cloreto de zinco
ZnT1 – Transportador de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	25
1.2 DANOS OXIDATIVOS	26
1.2.1 Lipoperoxidação	27
1.2.2 Oxidação de proteínas	30
1.2.3 Dano oxidativo ao DNA	31
1.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	33
1.4 METAIS, DANO CELULAR E O SISTEMA ANTIOXIDANTE.	42
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVOS GERAIS	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 ESPÉCIES UTILIZADAS	48
4.2 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E EXPOSIÇÃO	49
4.2.1 Estudo 1:Efeitos protetores do selênio em mexilhões <i>Mytilus edulis</i>	49
4.2.2 Estudo 2: Análise temporal da exposição à zinco em mexilhões <i>Perna perna</i>	50
4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	51
4.3.1 Estudo 1:Efeitos protetores do selênio em mexilhões <i>Mytilus edulis</i>	51
4.2.2 Estudo2 Análise temporal da exposição à zinco em mexilhões <i>Perna perna</i>	52
4.4 ANÁLISE QUÍMICA DOS NÍVEIS DE SELÊNIO E COBRE NA ÁGUA E TECIDO:	53
4.4.1 Estudo 1:Efeitos protetores do selênio em mexilhões <i>Mytilus edulis</i>	53
4.5 ANÁLISE DE TIÓIS:	53
4.5.1 Estudo 1: Efeitos protetores do selênio em mexilhões <i>Mytilus edulis</i>	53
4.5.2 Análise temporal da exposição à zinco em mexilhões <i>Perna perna</i>	54
4.6 ANÁLISES ENZIMÁTICAS	54
4.7 DANO AO DNA (TESTE DO COMETA)	57

4.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PERÓXIDOS TOTAIS E DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	58
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5. RESULTADOS	60
5.1. ESTUDO 1: EFEITOS PROTETORES DO SELÊNIO EM MEXILHÕES <i>MYTILUS EDULIS</i>	60
5.1.1 Exposição do mexilhão <i>Mytilus edulis</i> a cobre com ou sem pré-exposição a selênio	60
5.1.2 Glutathiona total (GSH-t) e tióis protéicos (PSH) em brânquias	62
5.1.3 Atividade de enzimas antioxidantes	62
5.1.4 Dano ao DNA estimado pelo teste do cometa.....	63
5.2 ESTUDO 2: ANÁLISE TEMPORAL DA EXPOSIÇÃO À ZINCO EM MEXILHÕES <i>PERNA PERNA</i>	64
5.2.1 Efeitos do zinco sobre o estado tiólico celular	64
5.2.2 Efeitos do zinco sobre enzimas antioxidantes	65
5.2.3 Efeitos do zinco sobre marcadores de estresse oxidativo...	67
6. DISCUSSÃO.....	69
6.1. ESTUDO 1: EFEITOS PROTETORES DO SELÊNIO EM MEXILHÕES <i>MYTILUS EDULIS</i>	69
6.1.1 Níveis de selênio e cobre na água e nos tecidos	69
6.1.2. Alterações em parâmetros antioxidantes.....	69
6.1.3 Dano ao DNA.....	71
6.1.4 Selenoproteínas	71
6.2 ESTUDO 2:ANÁLISE TEMPORAL DA EXPOSIÇÃO À ZINCO EM MEXILHÕES <i>PERNA PERNA</i>	73
6.2.1 Estado tiólico celular e glutathiona redutase.....	73
6.2.2 Amplificação das defesas antioxidantes	74
6.2.3 Efeitos oxidativos da exposição ao zinco.....	76
7. CONCLUSÃO.....	79
PERSPECTIVAS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas intra- e extracelulares, criando então o chamado “paradoxo do oxigênio”, devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens. Essas substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\bullet) (HALLIWELL *et al.*, 2007). Na Figura 1 podemos observar os potenciais de redução do oxigênio molecular e das diferentes ERO. O valor negativo do potencial de redução do oxigênio demonstra sua fraca capacidade oxidante e reatividade quando comparado com as demais moléculas derivadas de sua redução parcial, sendo o radical hidroxil o mais reativo.

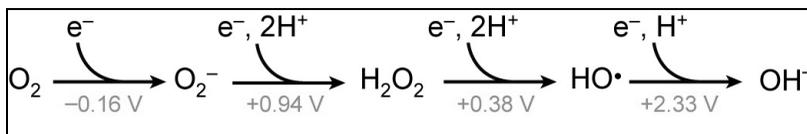


Figura 1: O estado redox e o potencial de redução do oxigênio e seus derivados. Abreviações: O_2^- , radical ânion superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; HO^\bullet , radical hidroxil; OH^- hidroxila. (IMLAY, 2008)

Algumas dessas ERO são radicais livres, outras são agentes oxidantes não radicalares (como o peróxido de hidrogênio). O próprio termo “reativo” acaba criando certa confusão, uma vez que há bastante diferença entre as constantes de reatividade do peróxido de hidrogênio ($k = 2.26 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (CARBALLAL *et al.*, 2003) e do radical hidroxil com a albumina ($k = >10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (HALLIWELL *et al.*, 2007), por exemplo. Além disto, algumas destas moléculas reagem rapidamente apenas com algumas substâncias, como é o caso do peróxido de hidrogênio, enquanto outras, como radical hidroxil, reagem rapidamente com inúmeras moléculas. Estas características geram diferentes níveis de

efeitos biológicos, dependendo da sua taxa e local de formação, ambiente, compartimento celular, etc. Para uma melhor explicação do termo radical livre, ele acaba sendo designado para qualquer espécie capaz de existência independente (por isso o termo livre), que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL *et al.*, 2007), além de incluir outras espécies radicalares que não somente as ERO, como por exemplo, aquelas centradas em carbono e nitrogênio.

Para lidar com este paradoxo, a célula possui uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério destas ERO geradas pelo metabolismo aeróbio, organizada em diferentes níveis. Estas defesas são comumente chamadas de defesas antioxidantes, e podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta. Estas estratégias de defesa incluem diferentes níveis de proteção, que podem ser resumidos em três formas principais de atuação: evitar a formação de ERO, a neutralização destas espécies reativas e a reparação de danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL *et al.*, 2007). É interessante observar que, mesmo a nível fisiológico, não há uma total prevenção na formação/atuação das ERO. Alguns trabalhos têm demonstrado que, mesmo em pequenas concentrações, estas moléculas não só não causam grandes danos, como podem adquirir importantes funções celulares. Por exemplo, a sinalização celular, ao longo da história evolutiva dos seres vivos, utiliza processos oxidativos como sinalizadores, além de outros mecanismos. Alguns exemplos são: controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos a células endoteliais ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra patógenos (DROGE, 2002).

1.2 Danos oxidativos

O ataque de ERO a biomoléculas (Fig. 2) pode causar disfunções celulares (YU, 1994). Alterações relacionadas ao ataque de ERO podem ser causadas por sua excessiva formação e/ou ineficiência em sua interceptação pelas defesas antioxidantes, gerando o chamado estresse oxidativo. Este pode ocorrer devido à ação de xenobiontes, através da alteração na regulação redox celular, pelo metabolismo de citocromos P450, ou ainda, pela presença de íons metálicos livres, gerando ciclos de reações oxidativas (REGOLI *et al.*, 2002).

Os tipos de dano oxidativo causado pelas ERO a biomoléculas (Fig. 2) podem ser dividido em três categorias principais, conforme visualizado na Figura 1, e descritos a seguir.

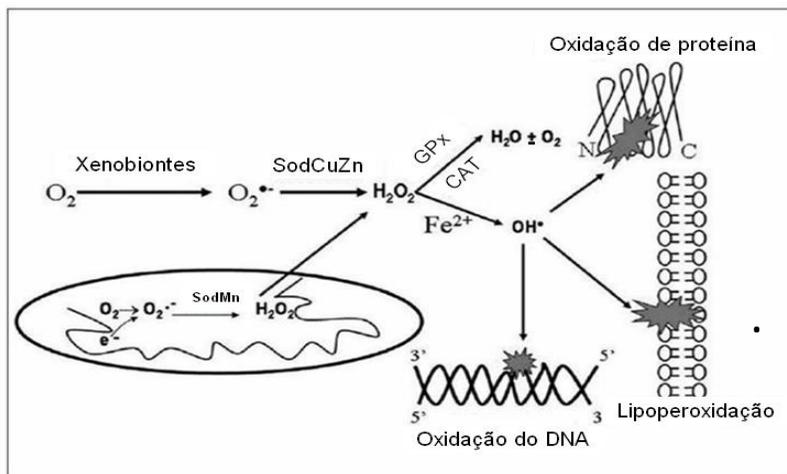


Figura 2: Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio na presença ou não de xenobiontes. Xenobiontes podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar danos a proteínas, lipídios e DNA caso as defesas antioxidantes celulares não sejam capazes de neutralizá-las antes de reagir. $O_2^{\bullet -}$ - Radical ânion superóxido; H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio; OH^{\bullet} - Radical hidroxil; SodMn - Superóxido Dismutase-Manganês; SodCuZn - Superóxido Dismutase-Cobre/Zinco; GPx - Glutathiona Peroxidase; CAT - Catalase (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2007).

1.2.1 Lipoperoxidação

O ataque a cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (com dois ou mais carbonos de sua cadeia com ligação dupla) pode ocorrer através de processos de peroxidação, que é uma reação em cadeia envolvendo três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. O começo desta reação geralmente ocorre através da abstração de átomo hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2-$) através do ataque de uma molécula reativa, como ERO, metais, ou outros radicais livres, formando um radical centrado em carbono. Este, por sua vez, realizará um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil (ROO^{\bullet}). A partir da

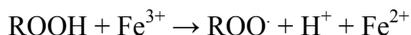
formação deste radical ocorre a fase de propagação, devido à sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metílicos de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo ROO·. Este reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cadeia (Fig. 3) (HALLIWELL *et al.*, 2007).

Ao mesmo tempo, quando o átomo de hidrogênio é abstraído das cadeias adjacentes pela reação com ROO·, forma-se um peróxido lipídico (ROOH) (Fig. 3). Este peróxido é geralmente estável sob temperatura fisiológica, mas na presença de íons metálicos, pode iniciar um novo tipo de reação em cadeia, quebrando a ligação O-O, formando um radical alcoxil (ROH·) (HALLIWELL *et al.*, 2007).



Estes radicais alcoxilas também podem abstrair átomos de hidrogênio, tanto de outros peróxidos como de grupos metílicos de ácidos graxos poliinsaturados, continuando as reações em cadeia.

Outro grande problema destas reações é a oxidação de metais de transição, tais como o Fe^{3+} , o qual também pode reagir com peróxidos lipídicos formando radicais peroxilas e Fe^{2+} , em um ciclo autosustentável (HALLIWELL *et al.*, 2007).



Vários fatores contribuem para o término deste processo cíclico de lipoperoxidação, tais como a neutralização desses inúmeros radicais por antioxidantes, formação de produtos não radicalares, consumo dos reagentes, dentre outros.

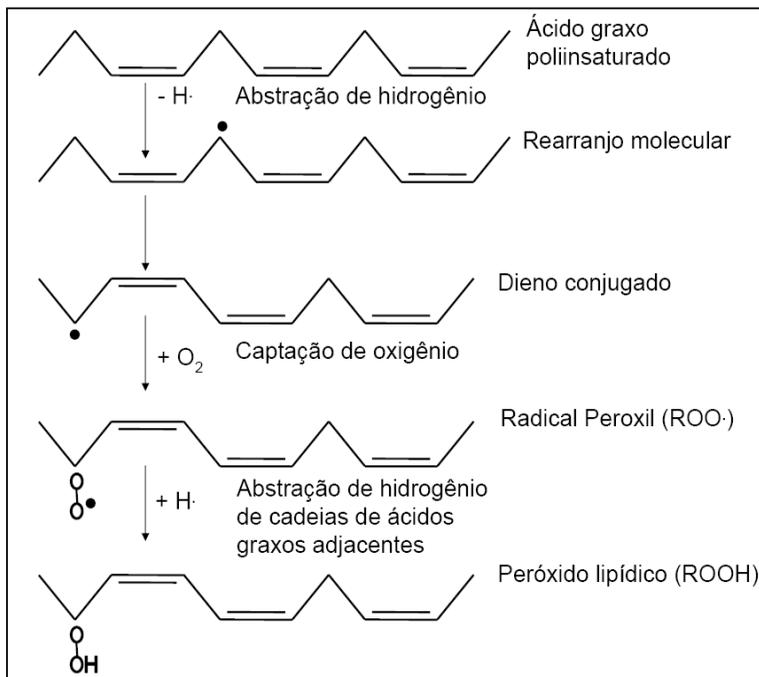


Figura 3: Reações envolvidas na peroxidação lipídica. A abstração de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias poliinsaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico. (HALLIWELL *et al.*, 2007)

Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxynonenal (4-HNE). Acredita-se que níveis elevados de 4-HNE (acima de 1 μM) atuem em processos citotóxicos e genotóxicos, provocando danos mitocondriais, inibindo a ação de chaperonas e algumas isoformas de citocromos P450 (CYP2E1 e CYP1A1), síntese de DNA e de proteínas (HALLIWELL *et al.*, 2007). Entretanto, o 4-HNE também é um potente indutor de defesas antioxidantes. Já o MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, resultando em modificações de inúmeros resíduos de aminoácidos (especialmente lisina). Ele ainda pode reagir

com bases de DNA (especialmente guanina) gerando lesões mutagênicas. Outra importante característica do MDA é sua capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico sob altas temperaturas e baixo pH, gerando um produto com cor que pode ser detectada em 532 nm (DRAPER *et al.*, 1990), base para método de detecção de produtos finais de lipoperoxidação.

1.2.2 Oxidação de proteínas

O dano a proteínas pode ocorrer pelo ataque direto de ERO à sua estrutura, ou através de moléculas originadas de processos de oxidação, como o MDA e 4-HNE.

Como a estrutura primária de uma proteína pode ser muito variável, esta pode sofrer inúmeros tipos de processos oxidativos (Fig. 4), gerando diferentes produtos finais. Além disso, as próprias ligações peptídicas podem ser atacadas, como por exemplo, na abstração de hidrogênio pelo radical hidroxil. No geral, este radical exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto que o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e óxido nítrico ficam mais restritos aos ataques de grupos facilmente oxidáveis, como os grupos tióis. Uma vez que as proteínas podem facilmente combinar-se a íons metálicos, e caso sejam posteriormente expostas a peróxido de hidrogênio, pode ocorrer a reação de Fenton, e conseqüentemente, a formação de radical hidroxil. Inicialmente, o ataque de $\cdot\text{OH}$ pode gerar outros radicais capazes de combinar com o O_2 , gerando radicais alcoxilas e peroxilas, os quais podem fazer a abstração de H e formar peróxidos nas cadeias laterais ou na cadeia central das proteínas. Os radicais alcoxil podem ainda realizar fragmentações de proteínas, formando grupos carbonilas. Assim como os peróxidos lipídicos, os peróxidos aminoacídicos são estáveis à temperatura fisiológica, mas na presença de calor ou de íons metálicos podem formar novos radicais orgânicos, gerando reações cíclicas. Eles também podem atacar grupos tiólicos de outras proteínas, assim como os peróxidos lipídicos, e sua degradação é extremamente difícil por não serem substratos para as enzimas antioxidantes catalase, glutatona peroxidase ou a peroxiredoxina (HALLIWELL *et al.*, 2007).

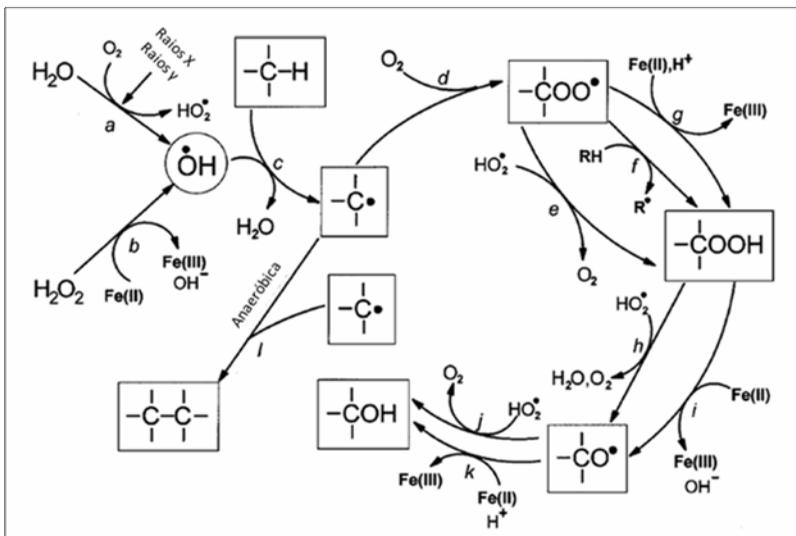


Figura 4: Oxidação da cadeia polipeptídica de proteínas por espécies reativas de oxigênio. Radicais hidroxilas (OH^\bullet) gerados por raios X, γ (a) ou pela reação de Fenton (b) atacam um carbono da cadeia polipeptídica, causando a abstração de um hidrogênio (c). Este, na presença de oxigênio (d) é rapidamente convertido a um radical peroxil. A forma protonada do ânion superóxido (HO_2^\bullet) (e) ou a abstração de um hidrogênio de outra molécula (f) pode transformar esse radical peroxil em um peróxido de alquila. Reações em cadeia com a forma protonada do ânion superóxido (h, j) ou com o íon Fe(II) (g, i, k) pode gerar como produto final um grupo hidroxila no carbono originalmente atacado na reação c. Na ausência de oxigênio (l), dois radicais centrados em carbono podem reagir entre si, produzindo derivados com ligações carbono-carbono cruzadas. (STADTMAN *et al.*, 2003).

1.2.3 Dano oxidativo ao DNA

Os radicais livres estão envolvidos com processos de envelhecimento, desenvolvimento de câncer, mutações e morte celular, através de alterações químicas, tanto nas bases nitrogenadas, na ribose do DNA ou pela quebra de suas ligações.

A ERO com maior capacidade de causar danos ao DNA é o radical hidroxil. Ele tem a capacidade de adicionar ligações duplas nas bases heterocíclicas de DNA, assim como, de abstrair hidrogênio da base nitrogenada timina e de cada um dos carbonos da desoxirribose. Além disso, reações de adição podem formar adutos de radical OH^\bullet que, na

presença de oxigênio, pode vir a formar radicais peróxil. O processo de formação de adutos pode ser utilizado como marcador de dano oxidativo ao DNA. O produto 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (comumente chamado de 8-oxodGuo) pode ser detectado através da técnica de cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica (HPLC-ECD; Fig. 5; DIZDAROGLU *et al.*, 2002).

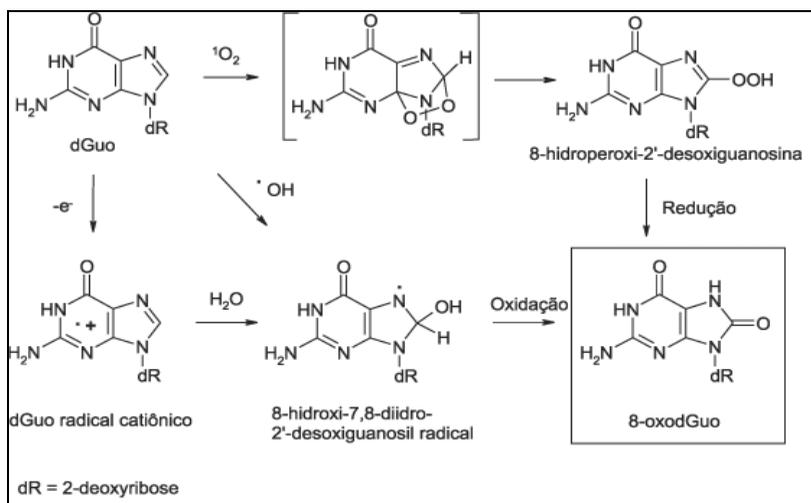


Figura 5: O mecanismo de formação de produtos de guanina a partir de reações de oxidação. Radical hidroxil (OH^\bullet), elétrons livre (e^-) e oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) (BERRA *et al.*, 2006).

A abstração de átomos de hidrogênio feita por este radical leva à formação de radicais centrados em carbono que, na presença de oxigênio, são rapidamente convertidos a radicais peróxil de açúcares. A partir de processos de rearranjo molecular, fragmentação e reações de hidrólise é possível gerar mais de 20 tipos de produtos derivados (DIZDAROGLU *et al.*, 2002).

Algumas proteínas nucleares podem ser atacadas pelo radical hidroxil, e posteriormente realizar ligações cruzadas com o DNA, ocasionando falhas no reparo celular, replicação, transcrição e descondensamento da cromatina (DIZDAROGLU *et al.*, 2002).

1.3 Defesas antioxidantes

Entre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula estão as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutationa (GSH), todos sendo captadores de radicais. A GSH é composta por gama-glutamil-cisteinil-glicina, atuando contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofilicos. Essa capacidade antioxidante se dá pelo grupamento reativo de sua cisteína, o grupamento tiol (-SH; Fig.6), o qual também pode ser encontrado em proteínas (PSH) ou em outros tióis de baixo peso molecular (NPSH), como a cisteína (REISCHL *et al.*, 2007). A oxidação da glutationa leva a formação da sua forma disulfeto (GSSG), a qual será posteriormente reciclada à GSH ou transportada para fora da célula.

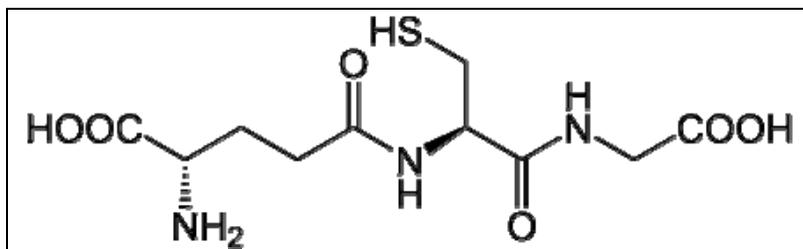


Figura 6: Estrutura química do tripeptídeo glutationa. O grupamento tiol (-SH) está presente no resíduo de cisteína. Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Glutathion.svg>. Acessado em: maio de 2010.

A GSH pode reagir *in vitro* com várias ERO, como radical hidroxil, ácido hipoclorito, peróxinitrito e peróxidos orgânicos. Por estar presente em concentrações intracelulares na ordem de mM, ela também pode reagir com ERO *in vivo*. Além disso, participa como cofator de diversas enzimas e processos metabólicos, como o sistema da glutationa peroxidase, metabolismo do ascorbato, protege tióis protéicos contra oxidação e atua como principal tampão redox celular. Na concentração de 1 mM, o potencial de redução é de -220 mV, e desta forma torna-se uma importante fonte de neutralização de ERO (HALLIWELL *et al.*, 2007).

A GSH é sintetizada no citoplasma de todas as células animais, mas o fígado é o órgão com a síntese mais ativa nos vertebrados. Ela pode ser encontrada em outras organelas, como núcleo, retículo

endoplasmático e mitocôndria. No núcleo, ela participa na manutenção dos grupos sulfidrilas necessários para o reparo e expressão do DNA, além de doar elétrons para a síntese de DNA. No retículo, encontra-se principalmente na forma oxidada, auxiliando a manter o ambiente oxidativo para a formação de pontes dissulfeto e a correta conformação de novas proteínas. Na mitocôndria, assim como no citosol, atua como importante antioxidante em reações diretas ou acopladas a enzimas, além de atuar como tampão redox. A concentração de GSH mitocondrial é semelhante à citoplasmática, em torno de 10-15 mM, mas corresponde somente a 10-20% da GSH total celular, uma vez que as mitocôndrias ocupam cerca de um quinto do volume total da célula (MARÍ et al., 2009). No citoplasma, sua síntese é realizada em duas etapas, com gasto de 2 moléculas de ATP, realizadas pelas seguintes enzimas:

1. Glutamato-cisteína ligase (GCL): catalise da primeira etapa, através da formação do dipeptídeo γ -glutamil-cisteína. A ligação entre o grupo amina da cisteína e o grupo carboxil da cadeia lateral do glutamato (carbono γ) (Fig. 6) é uma ligação incomum na estrutura dos peptídeos, geralmente ocorrendo entre o carbono α (o qual contém o carbono quiral) de um aminoácido e o grupo amina de outro aminoácido.

2. Glutathione sintetase (GS): catalise da segunda etapa, através da formação da GSH a partir do dipeptídeo formado na etapa anterior e adição do aminoácido glicina.

A GSH está em constante renovação dentro da célula. Este processo pode envolver o transporte de GSSG para fora da célula por transportadores dependentes de ATP. No fígado, a GSH está em constante síntese e transporte para o plasma, a fim de fornecer substrato para sua síntese e para a síntese proteica em outros tecidos. Devido a ligação gama existente entre os resíduos de glutamato e de cisteína na GSH, esta ligação não pode ser clivada por peptidases comuns: a proteína de membrana γ -glutamyltranspeptidase (GGT, descrita a seguir) é responsável pela clivagem da GSH extracelular para posterior incorporação da célula, a fim de fornecer os precursores necessários para sua síntese (WHITFIELD, 2001).

As defesas antioxidantes enzimáticas também são fundamentais (Fig. 7). Entre as principais estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx), tioredoxina redutase (TRxR), Peroxiredoxina (Prx) e glicose-6 fosfato desidrogenase, conforme descritas a seguir.

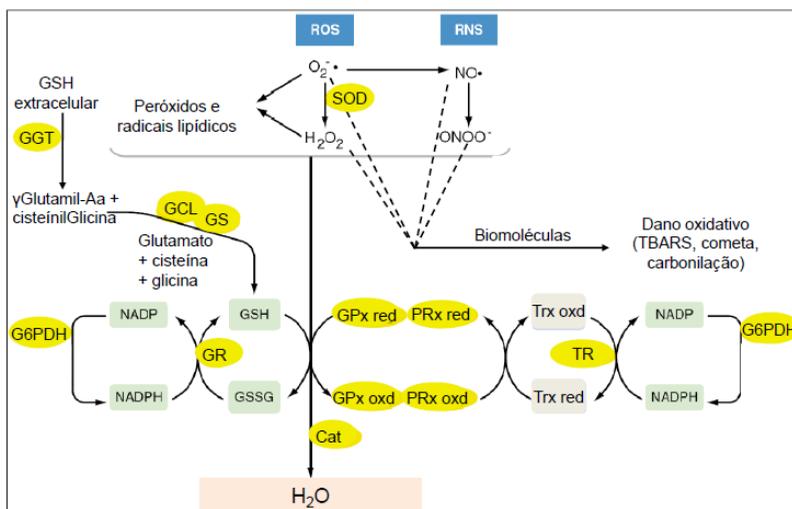


Figura 7: Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Legenda: $O_2^{\cdot-}$ - Ânion superóxido; NO - Óxido nítrico; ONOO $^{\cdot}$ - Peróxido nitrito; H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio; SOD - Superóxido Dismutase; GGT - gamma-glutamil transpeptidase; GCL - gamma-glutamil-cisteinil ligase; GS - glutatona sintetase; G6PDH - glicose-6 fosfato desidrogenase; GR - glutatona redutase; GPx red - Glutaciona Peroxidase reduzida; GPx oxd - glutaciona peroxidase oxidada; Prx red - peroxiredoxina reduzida; Prx oxd - peroxiredoxina oxidada; CAT - Catalase; GSH - glutatona reduzida; GSSG - disulfeto de glutaciona; NADP - nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato oxidado; NADPH - nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; Trx oxd - tioredoxina oxidada; Trx red - tioredoxina reduzida; TR - tioredoxina redutase. (KENSLE *et al.*, 2007).

A descoberta da SOD foi responsável pela definição da teoria de toxicidade do oxigênio, onde ERO são importantes produtos metabólicos (FRIDOVICH, 1995). A SOD é uma metaloenzima que age sobre o radical $O_2^{\cdot-}$ dismutando-o a H_2O_2 e protegendo em até 97% os alvos do ataque do ânion superóxido. Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas, no citosol a forma SOD-CuZn (possui cobre e zinco em seu sítio ativo), enquanto que na mitocôndria a forma SOD-Mn (com manganês em seu sítio ativo). A SOD-CuZn é capaz de aumentar a taxa de dismutação do radical ânion superóxido em 3 ordens de grandeza, através de reações redox do cobre presente em sua estrutura: após a redução do Cu^{2+} a Cu^+ pelo ânion superóxido, ocorre a

formação de oxigênio molecular. Em seguida, a reação com outro ânion superóxido, na presença de prótons, causa a oxidação do Cu^+ a Cu^{2+} , e formação de peróxido de hidrogênio. A reação geral é descrita como: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ = \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. O zinco não tem função catalítica, mas é responsável pela coordenação estrutural da enzima, auxiliando em sua estabilidade. No caso da SOD-Mn, a reação ocorre da mesma forma que com o cobre da SOD-Cu/Zn, através da redução do Mn^{3+} a Mn^{2+} e a formação de oxigênio molecular, seguido da oxidação do Mn^{2+} a Mn^{3+} na presença de prótons e outro ânion superóxido. Em pH fisiológico, a taxa de reação dessas duas isoformas de SOD é basicamente a mesma, em torno de $1 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (HALLIWELL *et al.*, 2007).

Para a eliminação de peróxidos existem duas enzimas principais, a CAT e a GPx. A CAT tem como função dismutar diretamente o H_2O_2 em H_2O e O_2 , e está localizada em maior abundância em peroxissomos. Como o peróxido de hidrogênio pode se difundir entre membranas, uma importante fonte de defesa contra peróxido de hidrogênio é a CAT presente na corrente sanguínea (WINTERBOURN *et al.*, 1987), protegendo órgãos e tecidos que contêm pouca atividade catalase, como músculo esquelético, coração e cérebro, contra o ataque do peróxido de hidrogênio formado no sangue pela autooxidação da hemoglobina.

A CAT é uma proteína composta de 4 subunidades, cada uma com um grupo hemo, o qual contém ferro (REID *et al.*, 1981). É através do grupo hemo que ocorre a atividade catalítica da enzima (Fig. 8): O ferro, inicialmente na forma Fe^{3+} , ao receber dois elétrons do peróxido de hidrogênio é oxidado a um radical catiônico Fe^{4+} (hemo⁺) gerando uma forma intermediária da enzima e uma molécula de água. Esta forma intermediária retorna a forma Fe^{3+} pela redução através de uma nova molécula de H_2O_2 , formando uma molécula de água e oxigênio.

A GPx com atividade peroxidásica contra peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos está relacionada à função antioxidante da GSH. São conhecidas pelo menos 4 isoformas de GPx: GPx1, presente no citoplasma; GPx2 presente nas células gastro-intestinais; GPx3, presente no plasma e outros fluídos extracelulares; GPx4, responsável pela degradação de peróxidos derivados de ácidos graxos e colesterol, presente em baixas concentrações nos tecidos, exceto nos testículos. A GPx1, 2 e 3 contém 4 subunidades, cada uma com um selênio, enquanto a GPx4 é um monômero com apenas 1 selênio. O selênio está presente na forma de selenocisteína, uma cisteína com um selênio no lugar do átomo de enxofre, o qual é facilmente ionizável em pH fisiológico (HALLIWELL *et al.*, 2007). O mecanismo de ação da GPx pode ser observado na Figura 9.

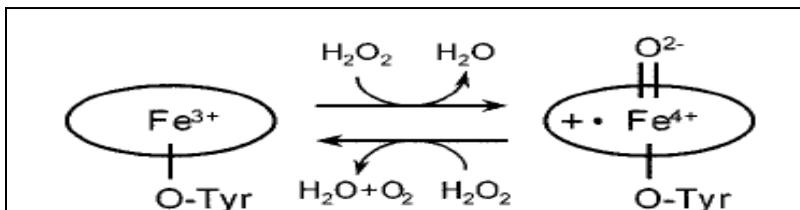


Figura 8: Mecanismo catalítico da catalase. A oxidação por dois elétrons da forma Fe^{3+} pelo peróxido de hidrogênio leva a formação de um radical catiônico Fe^{4+} . Uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio reduz o grupo hemo à sua forma Fe^{3+} , gerando água e oxigênio. (KIM *et al.*, 2002).

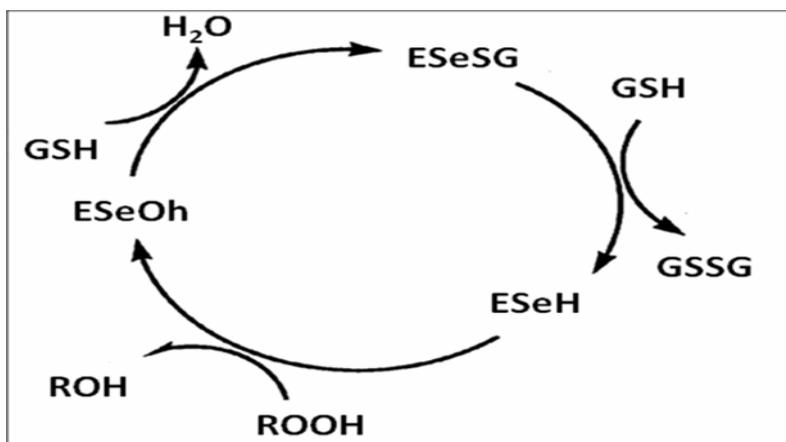


Figura 9: Mecanismo de ação da glutatona peroxidase. O selenol, (ESeH) forma reduzida da selenocisteína é oxidado por peróxidos a ácido selênico (ESeOH). Em sequência, uma glutatona (GSH) reage com o ácido selênico, formado o selenil dissulfeto (ESeSG). Uma segunda molécula de GSH ataca o enxofre dessa molécula, gerando dissulfeto de glutatona (GSSG) e regenerando o selenol, completando o ciclo catalítico. (REN *et al.*, 2001).

Processos oxidativos celulares e a atividade GPx geram o dissulfeto da glutationa ou glutationa oxidada (GSSG). Para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão entre glutationa reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é mantida em níveis acima de 1/100 (SIES *et al.*, 1978). Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutationa redutase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular. A GR é uma proteína composta de duas subunidades, cada uma contendo uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD; Fig. 10). O FAD recebe elétrons do NADPH, passando os elétrons em seguida para a ponte dissulfeto no sítio ativo. Os grupos SH formados dentro do sítio ativo interagem com a GSSG, reduzindo a 2 GSH e a ponte dissulfeto é refeita dentro do sítio ativo da GR (BERKHOLZ *et al.*, 2008).

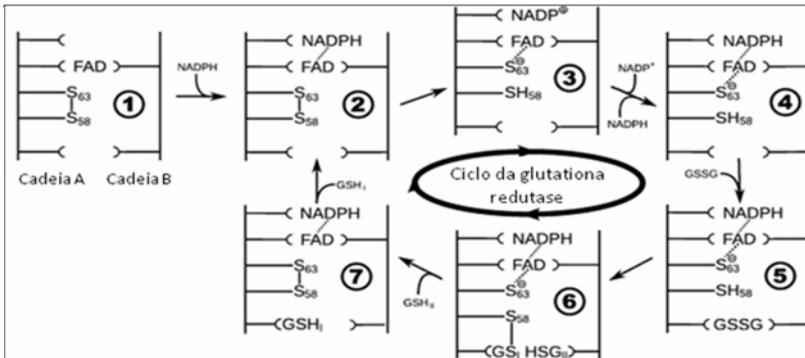


Figura 10: Mecanismo catalítico da glutationa redutase (GR). (1) GR na forma nativa (oxidada) recebe um elétron de uma molécula de NADPH (2) através do FAD, o qual repassa esse elétron para a ponte dissulfeto do sítio ativo (3). Uma nova molécula de NADPH se liga covalentemente a FAD (4), e a glutationa oxidada é inserida no sítio ativo da enzima (5). Uma das cisteínas (58) ataca covalentemente a GSSG (6), liberando uma molécula de GSH e refazendo a ponte dissulfeto entre as cisteínas do sítio ativo da enzima (7). Em seguida, a outra molécula de GSH é liberada, refazendo o início do ciclo catalítico. O NADPH que estava ligado covalentemente ao FAD pode repassar o elétron para a GR, reduzindo novamente a enzima (BERKHOLZ *et al.*, 2008).

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) não deixa de estar envolvida com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da glutationa também fica afetada, pois a GSSG não pode ser regenerada,

causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PDH também pode ser considerada uma enzima antioxidante coadjuvante (SLEKAR *et al.*, 1996).

A gama-glutamil transpeptidase (GGT) é uma glicoproteína ligada à membrana celular, responsável pela transferência de grupos glutamila da GSH para inúmeros aminoácidos ou peptídeos. Sua ação possibilita a captação de cisteína, que é o elemento limitante para a síntese de GSH (MEISTER, 1973). A GGT também é responsável pela degradação da glutatona, tornando-a disponível como fonte de cisteína para síntese protéica (TATEISHI *et al.*, 1977).

A GST é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofilicos a GSH, reduzindo sua toxicidade e permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular, posteriormente metabolizados pela via do ácido mercaptúrico. É importante lembrar que esse mecanismo de defesa mediado por GST depende de outros sistemas auxiliares: por um lado, o fornecimento constante de glutatona deve ser mantido para a biotransformação destes compostos, através das enzimas GCL e GS; por outro lado, os metabólitos originados devem ser excretado através de proteínas transmembrana transportadoras dependentes de ATP. São conhecidas diversas isoformas de GST, as quais podem possuir outras funções, como transporte intracelular de proteínas e atividade glutatona peroxidase. Esta última função ocorre pela capacidade das GSTs em conjugar GSH a peróxidos orgânicos, gerando GSSG e o respectivo álcool (HALLIWELL *et al.*, 2007).

As GSTs podem ser induzidas de duas formas: através de indutores monofuncionais ou bifuncionais. Indutores bifuncionais estão relacionados com o receptor hidrocarboneto aril (AhR), e aumentam a expressão de genes de biotransformação de fase I (*e.g.* citocromos p450) e fase II (*e.g.* GSTs). Dessa classe de indutores podem citar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), clássicos indutores bifuncionais. Já o grupo de indutores monofuncionais estão relacionados com a indução de genes de biotransformação de fase I, através de um mecanismo independente do AhR, ativando sequências gênicas relacionadas a amplificação de genes relacionados a resposta antioxidante/eletrofilica (sequências conhecidas como ARE; Blanchette *et al.*, 2007). As GSTs são divididas em inúmeras classes, baseadas nas sequências de aminoácidos, especificidade de substratos, estrutura quaternárias, entre outras.

Em mamíferos, são reconhecidas 7 classes de isoformas citosólicas: Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega, e Zeta, enquanto que

as classes Beta, Delta, Epsilon, Lambda, Phi, Tau, e “U” foram identificadas em não-mamíferos (Blanchette *et al.*, 2007). Todas essas classes participam de reações de conjugação, redução e isomerização, além de se ligar covalentemente a substâncias hidrofóbicas (atividade de transporte celular). A classe Kappa pertence à família das GSTs mitocondriais, também encontrada em peroxissomos, e podendo estar relacionada com beta-oxidação de ácidos graxos, através de atividade catalítica, transporte ou interação com poros de membranas, além de reduzir peróxidos orgânicos e detoxificar derivados de grupamento aril (Blanchette *et al.*, 2007). A última família de GST, as microssomais, está relacionada à produção de eicosanóides, além de algumas isoformas também contribuírem na detoxificação de compostos eletrofílicos, além de possuírem atividade peroxidásica (Blanchette *et al.*, 2007).

Nos últimos anos têm-se aumentando a atenção no sistema Prx/TrxR, outra importante fonte de detoxificação de peróxidos. A família das Prxs compreende 6 diferentes isoformas, responsáveis pela degradação de diferentes tipos de peróxidos através de seus resíduos de cisteína (Fig. 11). Entre os peróxidos metabolizados, incluem-se o peróxido de hidrogênio, além de peróxidos orgânicos de cadeias mais longas e hidrofóbicas, como o peróxido de cumeno, os peróxidos derivados de ácidos graxos ou de fosfolípidos, além do peroxinitrito. As 2-Cys Prxs possuem 2 cisteínas em sua estrutura: a cisteína peroxidásica (ou catalítica), e a cisteína de resolução (ou auxiliar). A cisteína peroxidásica é responsável pela redução do peróxido, tornando-se ácido sulfênico. Essa cisteína peroxidásica oxidada irá reagir com a cisteína de resolução de outra subunidade do dímero Prx, gerando uma ponte dissulfeto. A orientação das cadeias polipeptídica se dá na forma “*head to tail*”, ou seja, em paralelo com o N terminal de uma subunidade emparelhado com a região C terminal da outra. Desta forma, a cisteína peroxidásica oxidada de cada monômero irá reagir com a cisteína de resolução do outro monômero, formando 2 pontes dissulfeto (Fig. 11). Essas pontes dissulfeto serão reduzidas pela Trx, a qual ficará oxidada (FLOHE *et al.*, 2007).

As diferentes isoformas de Prx podem ser classificadas em Prx 1 ou 2-Cys, levando em consideração o número de cisteínas que participam do ciclo catalítico. Em mamíferos, apenas a Prx6 possui uma única cisteína envolvida no metabolismo de peróxidos. Neste caso, a oxidação da cisteína pelo peróxido leva à formação do respectivo álcool, enquanto a cisteína se encontra na forma de ácido sulfênico. Este será reduzido por moléculas de baixo peso molecular que contém tiol, entre elas GSH (também são apontados outros candidatos como ácido lipóico

e ciclofilina). Já as Prx 2-Cys ainda podem ser classificadas em típicas e atípicas. Durante o processo de redução do peróxido, pontes dissulfeto entre as cisteínas peroxidásicas e de resolução são formadas: se isso ocorrer entre diferentes monômeros, com a formação de um dímero, a Prx é classificada como Prx 2-Cys típica; se a ponte dissulfeto ocorrer dentro do próprio monômero, entre suas duas cisteínas, e conseqüentemente sem a formação de um dímero, a Prx é classificada como Prx 2-Cys atípica. Em ambos os casos, a redução da ponte dissulfeto é feita, mas não exclusivamente, pela Trx (WOOD *et al.*, 2003).

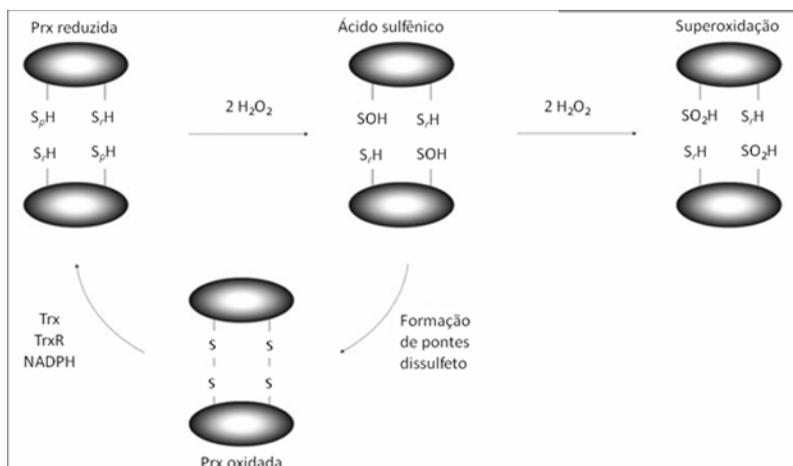


Figura 11: Mecanismo catalítico de 2-Cys peroxidoxina. O ciclo inicia com a oxidação da cisteína peroxidásica (S_pH) dos dois monômeros a partir do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) formando ácido sulfênico (SOH). Em seguida, cada cisteína de resolução (S_rH) reage com o ácido sulfênico do outro monômero, gerando duas pontes dissulfeto intermolecular. Este dímero é reduzido pela tioredoxina à custa de NADPH. No excesso de peróxido de hidrogênio, pode ocorrer a superoxidação da Prx, com a reação do ácido sulfênico da Prx oxidada, gerando ácido sulfinico (SO₂H) ou até mesmo sulfônico (SO₃H; LOW *et al.*, 2008).

A tioredoxina redutase é responsável pela ciclagem da tioredoxina, uma proteína doadora de elétrons envolvida no ciclo catalítico da Prx. Assim como a GR, a TrxR está envolvida no processo antioxidante celular por auxiliar no sistema Prx/Trx. Em mamíferos, a Trx e TrxR também podem atuar em outras moléculas e processos metabólicos, como no sistema imune, apoptose e na regulação da atividade de fatores

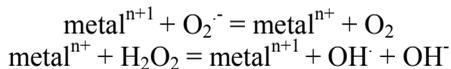
de transcrição, dependendo a função celular de cada tecido (NORDBERG *et al.*, 2001).

1.4 Metais, dano celular e o sistema antioxidante.

A exposição a metais pode levar a diversos processos patológicos, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer, processos inflamatórios, lesão tecidual, entre outros. Um dos mecanismos de toxicidade propostos para os metais é a formação de ERO, mesmo sabendo que cada metal pode atuar de maneira diferente dentro da célula. Essa formação de radicais livres pode ocorrer de maneiras distintas, mas podemos citar duas grandes vias: reações de Fenton e de Haber-Weiss. A reação de Fenton ocorre na presença de íons metálicos e de peróxido de hidrogênio, formando o radical hidroxila, ânion hidroxila e a oxidação do metal (Leonard *et al.*, 2004)



Na reação de Haber-Weiss, metais podem reagir com o ânion superóxido através de sua redução, gerando oxigênio molecular. Em sequência, esse metal previamente reduzido pode reagir com o peróxido de hidrogênio, gerando radical hidroxila (reação de Fenton), ou seja, ocorre a formação de radical hidroxil na presença elevada de metais e ânions superóxidos (Leonard *et al.*, 2004).



Outro importante mecanismo de geração de ERO por metais é a geração de radicais tiólicos, através da reação de íons metálicos com cisteínas (*e.g.* glutationa). Esses radicais tiólicos podem atacar outras moléculas tiólicas, gerando ânion superóxido (Leonard *et al.*, 2004).

Metais também podem formar complexos com proteínas e outras moléculas, através de ligações com nitrogênio, oxigênio e enxofre, e a força dessa ligação depende da natureza do metal e do ligante, devido à atração eletrostática entre essas duas moléculas. Dessa forma, tanto a carga como o tamanho do metal influenciam nessa força de atração. É importante lembrar que nem todas as interações são eletrostáticas, muitos complexos também podem ser originados através de ligações covalentes, onde o ligante doa elétrons para os metais. Com relação às características que podem influenciar estes complexos, pode-se citar o

número de sítios de coordenação, carga elétrica, tamanho de estruturas em forma de anel, etc. (Smart *et al.*, 2008).

Inúmeras substâncias químicas têm sido utilizadas para controlar o sistema antioxidante, principalmente através da inibição ou aumento da expressão de enzimas chave. Entre estas substâncias, podemos citar os inibidores da glutatona redutase (carmustina), da glutatona peroxidase (mercapto succinato), da tioredoxina redutase (compostos derivados de ouro, como auranofin e aurotiomalato), da síntese de glutatona (butionina sulfoximina), da glicose-6-fosfato desidrogenase (dehidroepiandrosterona), entre outros. Através destes estudos, estima-se obter informações sobre a importância de cada uma destas enzimas na homeostase celular e no sistema antioxidante em condições fisiológicas e também de desafios oxidativos.

Estudos envolvendo selênio, citotoxicidade e proteção em mamíferos vêm sendo realizados a décadas (RAYMAN, 2000; STEINBRENNER *et al.*, 2009). O selênio participa como cofator de enzimas envolvidas na síntese e metabolismo de hormônios da tireóide, além de estar presente no sítio ativo de enzimas, como a GPx e a TrxR. Sua deficiência pode causar problemas musculares, de articulações e reprodutivos (principalmente em machos, uma vez que a GPx participa da maturação do espermatozóides; RAYMAN, 2000). Sabe-se que suplementação com baixas concentrações de selênio levam a um aumento na síntese de GSH e na expressão e atividade de selenoproteínas, como GPx e TrxR em diferentes modelos de estudo (ADESIYAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010; WOJEWODA *et al.*, 2010), além de reduzir a mortalidade em peixes devido ao manejo de cultivo (HARDY *et al.*, 2010). Desta forma, espera-se que a suplementação com selênio cause um aumento na capacidade antioxidante celular devido ao aumento na expressão e na atividade da GPx e da TrxR, relacionadas com a detoxificação de peróxidos intracelulares.

O zinco é um metal de transição que participa na modulação de proteínas regulatórias e em diferentes atividades celulares (MACKENZIE *et al.*, 2005), sendo um micronutriente essencial e abundante em invertebrados como mexilhões (WONG *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2004). Em baixas concentrações, está relacionada a funções como expressão gênica, síntese de DNA, catálise enzimática, sinalização celular e neurotransmissão (FREDERICKSON *et al.*, 2000). Entretanto, níveis elevados de zinco intracelular podem levar a produção de ERO na mitocôndria, depleção de NAD^+ (KIM *et al.*, 1999) e inibição da glicólise (SHELIN *et al.*, 2000). Um dos efeitos mais marcantes do zinco sobre o sistema antioxidante celular é através da inibição da GR e

na alteração do metabolismo da glutathiona. Esta inibição já foi demonstrada por nosso grupo de pesquisa em bivalves (FRANCO *et al.*, 2006), peixes (FRANCO *et al.*, 2008b) e mamíferos (FRANCO *et al.*, 2008a). Essa inibição da GR pode causar um distúrbio redox celular, e diminuir a capacidade antioxidante celular, uma vez que a GR é responsável pela ciclagem da glutathiona utilizada no ciclo da GPx.

2. JUSTIFICATIVA

O sistema antioxidante tem sido amplamente estudado em mamíferos, devido à sua importância para a célula e às possíveis aplicações farmacológicas de drogas que estimulem ou inibam este sistema em situações patológicas. Porém, pouco se sabe a respeito deste sistema em bivalves marinhos. Estes animais têm sido utilizados como modelo em trabalhos de toxicologia aquática a fim de observar os efeitos de contaminantes antrópicos liberados nos ecossistemas aquáticos, e também em trabalhos de monitoramento ambiental para detectar locais impactados pela atividade humana. É importante que se estabeleçam bases e fundamentos teóricos desse sistema também para estes animais, a fim de complementar e facilitar as análises de dados destes trabalhos.

De acordo com dados obtidos pelo *ISI Web of Knowledge*[®] (Julho de 2010), se compararmos a quantidade de trabalhos científicos envolvendo o sistema antioxidante realizados em mamíferos com àquela de bivalves marinhos, temos aproximadamente: 15000 trabalhos com os termos “antioxidant and rat” contra 250 para mexilhões (“antioxidant and mussel”), 12000 envolvendo os termos “peroxidase and rat” contra 150 para “peroxidase and mussel”, 5000 itens envolvendo os termos “reactive oxygen species and rat”, contra 90 para “reactive oxygen species and mussel”. Desta forma, observa-se que é necessário se obter informações a partir de estudos de toxicologia aquática nestes modelos animais. O predomínio de dados com mamíferos pode até gerar dificuldade em compreender os processos de regulação antioxidante nestes animais, uma vez que a abordagem comparativa acaba sendo feita, muitas vezes, baseada em dados de mamíferos.

Em estudos de nosso grupo de pesquisa observamos que, após exposição aguda, o zinco causa inibição da GR *in vivo*, além de diversas outras alterações enzimáticas. Apesar dos efeitos em curto prazo do zinco em bivalves apresentar grande toxicidade, pouco se sabe sobre o efeito desse metal em estudos de exposição mais prolongada. Hoje em dia utilizam-se protocolos de monitoramento ambiental com 7 a 30 dias de exposição de invertebrados marinhos em ambientes potencialmente contaminados são os mais utilizados. Assim, são necessários estudos mais prolongados sobre os efeitos de compostos tóxicos sob os parâmetros antioxidantes destes animais. Além disso, desejamos observar se os efeitos em curto prazo no metabolismo da glutatona seriam mantidos após uma exposição mais prolongada ao zinco, ou se

iriam ocorrer mecanismos compensatórios para reverter esse quadro de toxicidade.

Em um estágio de 3 meses realizado na cidade de Plymouth, Inglaterra, sob orientação do professor Dr. John Moody, houve a possibilidade de se analisar os efeitos da suplementação com selênio sobre parâmetros antioxidantes de mexilhões. Já era conhecido que a suplementação com selênio era capaz de impedir os efeitos genotóxicos do mercúrio em hemócitos desses animais, porém não se conhecia os efeitos dessa suplementação em outros parâmetros antioxidantes ou em outros tecidos. Ao mesmo tempo, inúmeros trabalhos vêm demonstrando a toxicidade do cobre em bivalves marinhos, um metal naturalmente presente no ambiente aquático e também intimamente relacionado com contaminação industrial. Desta forma, o efeito antioxidante do selênio poderia contribuir para a proteção celular contra a exposição ao cobre.

Através destes dois modelos de estudos, espera-se compreender melhor o sistema antioxidante destes animais em situações de estresse oxidativo, seja através da inibição de uma importante enzima antioxidante (e conseqüentemente de um sistema de detoxificação de peróxidos) pelo zinco ou então pela exposição ao cobre, com seus conhecidos efeitos oxidantes intracelulares em contrapartida aos efeitos protetores do selênio.

3. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar as respostas do sistema antioxidante de bivalves marinhos após a indução de situações de estresse oxidativo.

2.2 Objetivos específicos

a) avaliar o metabolismo da glutatona e da glutatona redutase em mexilhões *Perna perna* e *Mytilus edulis*

b) avaliar os efeitos a curto e médio prazo da inibição da enzima glutatona redutase em mexilhões *P. perna* expostos ao zinco

d) avaliar os efeitos oxidativos do cobre e os efeitos antioxidantes do selênio em mexilhões *M. edulis*

e) avaliar o possível efeito protetor da pré-exposição de mexilhões *M. edulis* a selênio frente a uma subsequente exposição a cobre.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécies utilizadas

Para este trabalho, foram utilizadas duas espécies de bivalves marinhos: o mexilhão azul *Mytilus edulis* e o mexilhão marrom *Perna perna*.

O mexilhão azul entre 2,5 a 10 cm de comprimento foi alimentado com plâncton e detritos em suspensão através de filtração. Sua distribuição vai da Europa entre o Mar Branco (Rússia) e o Mediterrâneo, Japão e na América na costa ocidental (Carolina do Norte) e oriental (Califórnia) dos Estados Unidos da América (dados da Organização de Comida e Agricultura das Nações Unidas, <http://www.fao.org>; acessado em julho de 2010).

O mexilhão marrom possui entre 6 e 17cm de comprimento, se alimenta de plâncton e detritos em suspensão através de filtração, e pode ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico (dados do Banco de Dados Global de Espécies Invasivas, <http://www.issg.org>, acessado em julho de 2010).

Estes animais são sésseis, vivendo fixos a costões rochosos. São da família Mytilidae, pertencente ao filo Mollusca e classe Bivalvia. Possuem uma concha (consiste de duas valvas, por isso o nome bivalve) de forma alongada e assimétrica, ao contrário de outros bivalves, como o berbigão. A filtração, utilizada para a obtenção de alimento, é realizada através de um cífião, o qual permite a captação de água para as brânquias. Neste órgão, as partículas são carregadas até a boca através de cílios, onde serão ingeridas. Além de participar da alimentação, as brânquias também são responsáveis pelas trocas gasosas na respiração (RUPERT *et al.*, 1996)

A brânquia é um órgão muito estudado em trabalhos de toxicologia aquática por ser o primeiro contato do animal com contaminantes ambientais e/ou antrópicos. Posteriormente, estes contaminantes são transportados para outros tecidos, principalmente para a glândula digestiva, um dos principais locais de biotransformação e detoxificação destas substâncias, e também extensamente estudada em trabalhos de toxicologia ambiental.

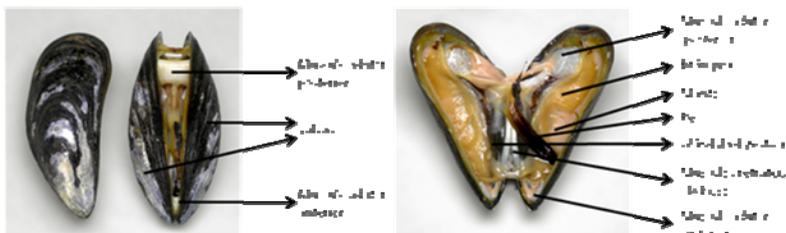


Figura 12: Anatomia de um bivalve marinho da família Mytilidae. À esquerda, o animal com as valvas entre-abertas mostrando o músculo adutor posterior e anterior. À direita, o animal com as valvas abertas e músculos adutores cortados, mostrando algumas das principais estruturas anatômicas.

4.2 Obtenção dos animais e exposição

4.2.1 Estudo 1: Efeitos protetores do selênio em mexilhões *Mytilus edulis*

Mexilhões azuis *Mytilus edulis* forma coletados na praia de Trebarwith (sudoeste da Inglaterra) e foram aclimatados em laboratório por 2 semanas, numa sala fria a 15 ± 0.2 °C sob constante aeração e alimentados com uma preparação comercial da alga unicelular *Isochrysis galbana* (Liquify, Inglaterra).

Após aclimação, os animais foram transferidos para aquários plásticos de 10 litros (9 animais por aquário e 1 litro de água do mar por animal) para exposição ao cobre e ao selênio (Tabela 1). Durante os primeiros 3 dias (“pré-exposição”), os animais foram expostos à água do mar (grupo Ctl) ou à 4 µg/L de selênio (grupo selênio, na forma de selenito de sódio). Durante os últimos 3 dias de experimento, (“exposição”) os animais foram expostos à água do mar ou 56 µg/L de cobre (grupo Cu, na forma de sulfato de cobre penta hidratado). Assim, obteve-se 4 diferentes grupos (“pré-exposição”/“exposição”): Ctl/Ctl; Ctl/Cu; Se/Ctl; Se/Cu, com três aquários por grupo. As concentrações de Se e Cu utilizados de basearam em trabalhos de bioquímica e toxicologia anteriores realizados com esta espécie ou espécies do gênero *Mytilus* (vide Tran *et al.*, 2007 para estudo com selênio, Bolognesi *et al.*, 1999 para cobre). Além disso, estudos do laboratório do Prof. John Moody observaram que a concentração de cobre de 56 µg/L não causa letalidade, entretanto induz danos no DNA (dados não publicados).

Ao fim de cada dia de exposição, uma alíquota de cada aquário foi coletada logo após a troca de água e antes da próxima troca de água, 24

horas depois. Desta forma, podem-se analisar as concentrações de selênio e de cobre ao começo e ao fim de cada dia de exposição.

Ao fim do sexto dia de exposição, os animais foram sacrificados, e os tecidos foram coletados, num total de 9 amostras por grupo, onde cada amostra foi obtida como descrita a seguir: após forçar levemente a abertura das valvas, a hemolinfa do músculo adutor posterior de 3 animais foi combinada (AL-SUBIAI *et al.*, 2009; Fig. 12) para obter uma amostra; após obtenção da hemolinfa, o músculo adutor posterior foi cortado, possibilitando a total abertura dos animais e a coleta dos tecidos. Brânquias de dois animais foram combinadas para análise das atividades enzimáticas e brânquias de indivíduos únicos foram utilizadas para análise de tióis. Após a remoção das brânquias, os animais foram congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise química no restante dos tecidos moles.

Tabela 1: Delineamento experimental do período de exposição. Mexilhões *Mytilus edulis* foram expostos ao selênio e/ou cobre durante 3 dias. O experimento foi dividido em duas etapas: durante os dias 1-3, os animais foram expostos à água do mar ou ao selênio; durante os dias 4-6 os animais foram expostos à água do mar ou ao cobre.

Grupos/Período	Dias 1-3	Dias 4-6
	Pré-exposição	Exposição
Ctl/Ctl	Água do mar	Água do mar
Se/Ctl	Selênio 4 $\mu\text{g/L}$	Água do mar
Ctl/Cu	Água do mar	Cobre 56 $\mu\text{g/L}$
Se/Cu	Selênio 4 $\mu\text{g/L}$	Cobre 56 $\mu\text{g/L}$

4.2.2 Estudo 2: Análise temporal da exposição à zinco em mexilhões *Perna perna*

Mexilhões marrom *Perna perna* foram obtidos de uma fazenda marinha de cultivo no Ribeirão da Ilha (Florianópolis, Brasil). Os animais foram aclimatados durante uma semana no laboratório em aquários de plástico (1 litro de água do mar por animal), temperatura de $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, aeração constante e alimentados com uma solução da alga

unicelular *Chaetoceros muelleri*, obtida no Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (CCA, UFSC).

Após aclimação, os animais foram mantidos durante 21 dias em aquários plásticos (6 animais/aquário e 1 litro de água do mar por animal) para exposição a 10 μM de cloreto de zinco (Zn) por 2, 7 ou 21 dias (Figura 13). Essa concentração foi escolhida baseada em trabalho anterior do grupo de pesquisa (Franco *et al.*, 2006), o qual demonstrou ser uma concentração não letal, mas capaz de causar distúrbio redox e inibição da GR em mexilhões *P. perna*. Durante o experimento, os animais foram alimentados com algas 1 hora antes da troca de água, para evitar possíveis interações com o zinco.

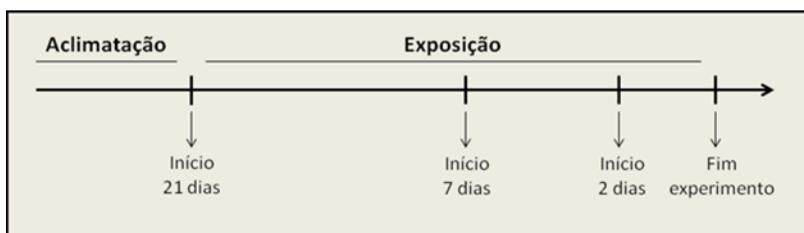


Figura 13: Delineamento experimental do período de exposição. Mexilhões *Perna perna* foram aclimatados por 7 dias (Aclimação) e em seguida expostos a zinco (Exposição) durante 2, 7 ou 21 dias, conforme indicado na figura.

Ao fim do período de exposição, os animais foram sacrificados e as brânquias foram retiradas para as análises bioquímicas. Um total de 12 animais por grupo ($n = 12$) foi utilizado para as análises bioquímicas.

4.3 Preparação das amostras

4.3.1 Estudo 1: Efeitos protetores do selênio em mexilhões *Mytilus edulis*

Para análise de glutathiona total (GSH-t), aproximadamente 100 mg de tecido fresco (recém dissecado, sem congelar) foi homogeneizado (3:1 vol:vol) em tampão TRIS/HCl 20 mM contendo EDTA 1 mM, sacarose 500 mM, 150 mM KCl pH 7,6 e centrifugado a 15.000 g por 35 minutos a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante (50 μL) foi diluída em 450 μL de tampão fosfato de potássio (KPi) 0,1 M EDTA 1 mM pH 7,0 para posterior análise espectrofotométrica.

Para análise dos níveis de tióis protéicos (PSH), 200 μL do sobrenadante de 15.000 g foi acidificado com ácido perclórico (PCA,

concentração final de 0,5 M) e em seguida centrifugado a 13.000 g por 2 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e a fração particulada foi ressuspensa em 300 µL de tampão TRIS/HCl 0,5 M contendo 1% SDS, pH 8,0.

Para análise da atividade enzimática nas brânquias, 200 mg de tecido foi homogeneizado (3:1 vol:vol) em tampão TRIS/HCl 20 mM contendo EDTA 1 mM, sacarose 500 mM, 150 mM KCl, pH 7,6 e centrifugado a 15.000 g por 35 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi guardado a -80 °C para posteriores ensaios enzimáticos.

Para análise de atividade enzimática na fração solúvel da hemolinfa, após homogeneização o extrato foi centrifugado a 1.000 g por 3 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi guardado a -80 °C para posteriores ensaios enzimáticos.

Para análise química dos níveis de selênio e cobre no tecido, os animais (todo o animal exceto as brânquias, usada para análises bioquímicas) foram desidratados em estufa a 60-80 °C durante 2 a 3 dias. Em seguida, o tecido foi retirado das conchas, e triturado manualmente com o auxílio de um cadinho e um pistilo de cerâmica até obter um pó de granulometria característica. Após utilizar uma peneira de malha de 180 µm para a retirada de partículas não trituradas. O tecido foi então pesado, e aproximadamente 300-500 mg foi utilizado para o processo de digestão, através da acidificação com 7 ml de ácido clorídrico (HCl) e ácido nítrico (HNO₃) concentrado (1,5:1 vol:vol) por uma hora a temperatura ambiente, em recipientes de vidro com 50 ml cobertos com vidro de relógio. Após esse tempo, os recipientes foram aquecidos em uma placa quente por 1 hora a aproximadamente 80 °C para finalizar a digestão das amostras, e ao final do processo o volume foi ajustado para 50 ml em balões de vidro com HNO₃ 2 %.

Para a análise química dos níveis de selênio na água, as amostras foram diluídas 10 vezes com HNO₃ 2 %, e adicionado metanol para uma concentração final de 5 % e um padrão interno com índio para posterior análise através de espectrofotometria de massa por ionização acoplada por plasma (ICP-MS). No caso das análises de cobre na água, as amostras foram diretamente analisadas por espectrofotometria de emissão ótica por ionização acoplada por plasma (ICP-OES).

4.2.2 Estudo 2 Análise temporal da exposição à zinco em mexilhões Perna perna

Para a determinação dos níveis de glutathiona total (GSH-t), tióis protéicos (PSH) e não-protéicos (NPSH), aproximadamente 100 mg de

brânquia foi homogeneizada em 0,9 ml de ácido perclórico (PCA) 0,5 M, centrifugado a 15.000 g por 2 minutos a 4 °C, e o extrato ácido foi utilizado para as determinações de GSH-t e NPSH. A fração particulada foi utilizada para a determinação de PSH.

Para análise da atividade enzimática e de marcadores de estresse oxidativo, aproximadamente 300-400 mg de brânquia foi homogeneizado em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 e centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então utilizado para a determinação da atividade enzimática, produtos finais da lipoperoxidação e níveis de peróxidos totais, enquanto a fração particulada foi utilizada para a determinação da atividade gama-glutamil transpeptidase.

4.4 Análise química dos níveis de selênio e cobre na água e tecido:

4.4.1 Estudo 1: Efeitos protetores do selênio em mexilhões Mytilus edulis

As amostras de água coletada diariamente e as amostras de tecido já digeridas (processo de tratamento químico das amostras, conforme explicado na seção anterior) foram utilizadas para a quantificação dos níveis de selênio e cobre. As amostras de tecido, assim como as amostras de água para análise de cobre, foram analisadas por ICP-OES (Varian, modelo 725-ES). As amostras de água para análise de selênio foram analisadas por ICP-MS (Thermo Scientific, modelo X Series 2). Os níveis de cobre e selênio foram calculados com tendo por base uma curva padrão feita com soluções certificadas (Fischer Scientific e Merk, Reino Unido). Os níveis de selênio na água ainda foram comparados e corrigidos com o padrão interno do metal Índio adicionado às amostras, a fim de observar possíveis variações nos resultados encontrados.

4.5 Análise de tióis:

4.5.1 Estudo 1: Efeitos protetores do selênio em mexilhões Mytilus edulis

Os níveis de GSH-t (GSH + 2GSSG) foram medidos espectrofotometricamente pelo método de ciclagem com glutatona redutase (OWENS *et al.*, 1965). Após a diluição de 10 vezes em tampão fosfato de potássio, 100 µL de amostra foi incubada em KPi 50 mM pH

7,5 contendo 2,5mM de EDTA e 5 mM de DTNB e deixada no gelo. Em seguida, 40 μ L da amostra incubada com DTNB foi adicionada num poço de uma placa de 96 poços contendo 210 μ L de tampão KPi na concentração final de 100 mM contendo EDTA 5 mM, NADPH 200 μ M, GR 0,4 U/ml pH 7,5, e lido em 412 nm por 5 minutos. A quantificação dos níveis de GSH-t foi calculada a partir de uma curva padrão com GSH realizada no momento da leitura.

O ensaio para análise de PSH foi realizado em placas de 96 poços, contendo 30 μ L de amostra em 300 μ L de tampão na concentração final TRIS/HCl 0,5 M, SDS 1 %, DTNB 0,2 mM pH 8,0, e lido em um leitor de placas em 412 nm após 30 minutos de incubação (ELLMAN, 1959). Em paralelo, as amostras foram lidas em uma segunda placa na presença do tampão e ausência do DTNB, para descontar a absorbância basal da amostra.

4.5.2 Análise temporal da exposição à zinco em mexilhões Perna perna

Para determinar a glutatona total (GSH-t), 50 μ L do extrato ácido foi neutralizado e diluído em 450 μ L de tampão KPi 0,1 M contendo EDTA 1 mM pH 7,0. Em seguida, as amostras foram analisadas pelo método enzimático de Tietze, modificado posteriormente (AKERBOOM *et al.*, 1981). As concentrações finais do ensaio foram de KPi 100 mM, EDTA 1 mM, NADPH 225 μ M, DTNB 100 μ M e GR 0,2 U/ml. As quantificações dos níveis de GSH-t e GSSG foram calculadas a partir de uma curva padrão com GSSG realizada no momento da leitura.

Para a análise dos níveis de NPSH, 100 μ L do extrato ácido foi adicionado a 400 μ L de tampão na concentração final TRIS/HCl 0,5 M, DNTB 0,2mM, pH 8,0. Para a análise de PSH, a fração particulada da amostra acidificada com PCA foi ressuspensa em 1 ml de tampão TRIS/HCl 0,5 M contendo SDS 1 % pH 8,0. Em seguida, 100 μ L dessa suspensão foi adicionada a 400 μ L de tampão na concentração final TRIS/HCl 0,5 M, SDS 1 %, DTNB 0,2 mM pH8,0. Paralelamente, as amostras também foram preparadas na ausência de DTNB, para descontar a absorbância basal da amostra (ELLMAN, 1959).

4.6 Análises enzimáticas

Para ambos os trabalhos, os métodos enzimáticos foram os mesmos, conforme descritos a seguir.

Catalase (CAT): A alta velocidade de reação desta enzima, associada a uma baixa “afinidade”, permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de H_2O_2 (10 mM). A atividade foi determinada pela velocidade de consumo da H_2O_2 no primeiro minuto da reação, 240nm ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; AEBI, 1984). É descontado ainda o desaparecimento do peróxido de hidrogênio sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 40 segundos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,012 % de Triton X-100. Como substrato iniciador utiliza-se 10 mM de H_2O_2 . A absorbância basal é descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra.

Gama-glutamil transpeptidase (GGT): A análise de sua atividade foi realizada através de um kit comercial da marca Biotécnica®, conforme recomendações do fabricante.

Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH): Na presença de glicose-6-fosfato, o NADPH é formado a partir de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP^+) e, dessa forma, o aumento da absorbância é medido em 340nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (GLOCK *et al.*, 1953). É descontada da reação a atividade basal obtida pela formação de NADPH pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato. O ensaio enzimático de 5 minutos é realizado em tampão TRIS/HCL 50 mM, pH 7,4 contendo 0,127 mM NADP^+ e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2). Como substrato iniciador utiliza-se 1,5 mM de glicose-6-fosfato (G6P). A absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência de G6P.

Glutaciona peroxidase selênio dependente (GPx-Se): Através deste ensaio, mede-se a atividade proveniente apenas da GPx-Se, que contém uma selenocisteína em seu grupo catalítico. Esta atividade é acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A enzima, ao utilizar GSH para degradar peróxido de hidrogênio, gera glutaciona oxidada (GSSG), que por sua vez, é reduzida pela glutaciona redutase adicionada ao meio de reação, que consome NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) proporcionalmente a formação de GSSG, e consequentemente da atividade GPx. Este consumo de NADPH é acompanhado espectrofotometricamente em 340nm, similar à determinação de GR (LAWRENCE *et al.*, 1976). Desta velocidade de consumo é descontado o consumo basal de NADPH, obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (peróxido). O ensaio enzimático de 5 minutos é realizado em tampão HEPES 30 mM, pH 7,5 contendo EDTA 0,7 mM, GSH 1,5 mM, GR 0,75 U/ml e NADPH 100

mM. Peróxido de hidrogênio (200 μ M) foi utilizado como substrato, e a oxidação do NADPH foi monitorado em 340nm.

Glutathiona redutase (GR): Ao utilizar o substrato GSSG a enzima consome NADPH, que é acompanhado em 340nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (CARLBERG *et al.*, 1985). Desta velocidade é descontada a reação basal de consumo de NADPH obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (GSSG). O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM GSSG.

Glutathiona peroxidase total (GPx): Através deste ensaio, mede-se a atividade glutathiona peroxidase proveniente da própria enzima GPx como da enzima glutathiona S-transferase, a qual também é capaz de doar elétrons da GSH para a detoxificação de peróxidos orgânicos. O ensaio enzimático se baseia no mesmo método da GPx-Se, porém utiliza-se peróxido orgânico para permitir a ação da glutathiona S-transferase no ensaio (WENDEL, 1981), o qual é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo NADPH 0,2 mM, GSH 1 mM e GR 0,2 U/ml. É necessário 5-10 minutos de incubação com os reagentes (exceto substrato iniciador) para a ativação da enzima. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM de peróxido de cumeno.

Glutathiona-S-transferase (GST): A conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (HABIG *et al.*, 1981). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 1 mM GSH. Como substrato iniciador foi utilizado 1 mM de CDNB. A absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra.

Tioredoxina redutase (TrxR): A TrxR é capaz de causar a redução do DTNB a duas moléculas de TNB, causando um aumento na absorbância em 412nm. Para descontar a formação basal de TNB através das reações dos tióis presentes na amostra com DTNB, as amostras são incubadas 15 minutos numa cubeta com tampão KPi 100mM contendo EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e albumina de soro bovino (BSA) 0,2 mg/ml. Após este tempo, a reação específica da TrxR

é iniciada através da adição de 200 μM de NADPH, acompanhando-se a formação de TNB em 412 nm (ARNER *et al.*, 1999).

4.7 Dano ao DNA (Teste do cometa)

Após a coleta da hemolinfa de mexilhões *Mytilus edulis*, 200 μL de hemolinfa foi adicionado a 300 μL de tampão fosfato salina (PBS) e centrifugado a 400 g por 2 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em agarose (0,75 % em tampão PBS) de baixo ponto de fusão. Em seguida, duas gotas da suspensão celular foram adicionadas em uma lâmina de microscópio (previamente cobertas com agarose comum, 1,5 %), cobertas com uma lamínula e deixadas em geladeira por 15 minutos para solidificação da agarose. As lamínulas foram retiradas, e as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, TRIS 10 mM, Triton X-100 1 % e DMSO 10 %, pH 10) por uma hora a 4 $^{\circ}\text{C}$ no escuro. Após a lise, as laminas foram colocadas na cuba de eletroforese horizontal e incubadas em tampão de neutralização eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 200 mM pH 13) por 40 minutos. Em seguida, a eletroforese foi iniciada a 400 mA e 25 V durante 30 minutos em uma câmara fria de 4 $^{\circ}\text{C}$ no escuro. Após a eletroforese, as laminas foram incubadas em tampão de neutralização (Tris/HCl 400mM pH 7,5) por 5 minutos, e o processo repetido 3 vezes. As lâminas foram, então, guardadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ por até uma semana antes da coloração (40 μL de iodeto de propídio 2 $\mu\text{g/L}$). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Leica modelo DMR HC (Leica Microsystems, Reino Unido) através da contagem de 100 células escolhidas aleatoriamente para cada lâmina. A percentagem de fragmentação do DNA (medida como a fluorescência presente na cauda do cometa, Fig. 14) foi medida através do software Komet 5 (Kinetic Imaging, Reino Unido), e é considerado um dos parâmetros mais confiáveis para medir quebras de fita simples e dupla, além de sítios álcali-lábeis (KUMARAVEL *et al.*, 2006).

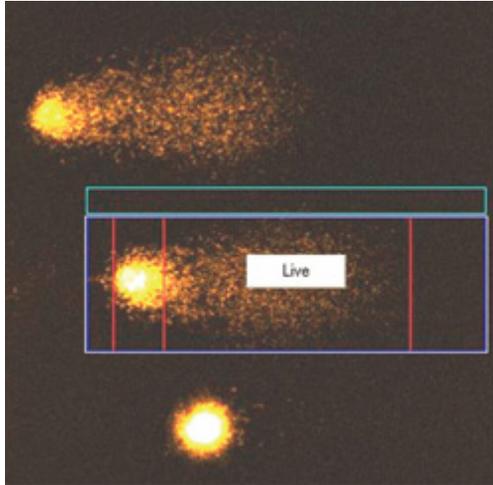


Figura 14: Ilustração da análise de dano ao DNA no teste do cometa, através do software Komet 5. O DNA intacto permanece na “cabeça” do cometa, enquanto que o DNA fragmentado migra para a “cauda”. Essa divisão é realizada pelo software, como visualizado pelos traços em vermelho na figura. Fonte: <http://www.setecltd.kr/product/komet/Figure%204.jpg>; acessado em julho de 2010.

4.8 Análise dos níveis de peróxidos totais e de peroxidação lipídica

A quantificação dos níveis de peróxidos totais do sobrenadante de brânquias de mexilhões *P. perna* foi realizada a partir do método de PCA-FOX (GAY *et al.*, 2002). A presença de peróxidos leva à redução do íon Fe^{2+} a Fe^{3+} , o qual reage com o sal *xylenol orange*, gerando uma cor característica (laranja/marrom), a qual pode ser medida fotometricamente em 560 nm. O ensaio é realizado em PCA 110 mM, contendo *xylenol orange* 0,25 mM e sulfato ferroso amoniacal 0,25 mM. A quantificação dos níveis de peróxidos foi realizada a partir da comparação com uma curva padrão de peróxido de cumeno.

Os produtos finais da peroxidação lipídica foram estimados pelo método de TBARS, como um índice de peroxidação lipídica (DRAPER *et al.*, 1990), com algumas modificações. Uma alíquota (100 μ l) da amostra foi adicionada a 1 ml de solução contendo 400 μ l de tampão ácido acético 1,3 M/HCl, 0,27 M, pH 3,4, 400 μ l TBA 0,8% e 200 μ l de SDS 8,1%. A mistura foi incubada a 95 °C por 60 minutos. A reação de

MDA com o TBA produz um cromóforo que pode ser medido fotometricamente a 532nm.

4.9 Análise estatística

A análise dos dados de ambos os trabalhos foi realizada no software STATISTIC 8 (StatSoft®, EUA). Para o trabalho com *M. edulis*, foi utilizada a análise de variância de 2 vias com interação, seguido do teste *post hoc* de Duncan quando necessário. Para o trabalho com *P. perna*, foi utilizada a análise de variância de uma via, seguido do teste *post hoc* de Duncan quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo 1: Efeitos protetores do selênio em mexilhões *Mytilus edulis*

5.1.1 Exposição do mexilhão *Mytilus edulis* a cobre com ou sem pré-exposição a selênio

Mexilhões *Mytilus edulis* foram pré-tratados com selênio (Se) por 3 dias, e subsequentemente por mais 3 dias com cobre (Cu), como descrito em Materiais e Métodos (seção 4.1.1). Dois grupos de animais (Se/Ctl e Se/Cu) foram expostos a selênio nos 3 primeiros dias (período de pré-exposição) e os outros dois grupos foram expostos ao cobre (Ctl/Cu e Se/Cu) durante os últimos 3 dias (período de exposição). Um grupo (Ctl/Ctl) não foi exposto nem a selênio nem a cobre. Durante os 6 dias de experimento, alíquotas de água dos aquário eram coletadas para medir os níveis de Se e Cu. Durante o período de pré-exposição (Fig. 15A) os níveis de Se permaneceram inalterados entre o início e o fim de cada dia, com valores próximos à concentração nominal de 4 µg/L. Foram detectados níveis de Se acima do limite de detecção (0,5 µg/L) apenas nos aquários onde foi adicionado Se. Nenhuma diferença foi observada nas concentrações de Se nos tecidos dos animais após os 6 dias de experimento (Fig. 15C).

Como esperado, durante o período de pré-exposição foram observados baixos níveis de Cu na água (aproximadamente 5 µg/L), mas durante o período de exposição os níveis de Cu alcançaram valores próximos à concentração nominal de 56 µg/L nos grupos Ctl/Cu e Se/Cu, enquanto que nos outros dois grupos os níveis foram similares aos do período de pré-exposição. Além disso, também foi observada uma diminuição de 20 a 30% nos níveis de Cu na água entre o início e fim de cada dia (Fig. 15B). A concentração de Cu nos tecidos dos animais dos grupos Ctl/Cu e Se/Cu após 6 dias de experimento foi de 3 a 5 vezes maior que nos grupos Ctl/Ctl e Se/Ctl (Fig. 15D). Também foi observada uma interação entre as exposições [$F(1, 31) = 5.51, p < 0.05$], o que pode ser explicado pela menor assimilação de Cu nos animais pré-expostos a Se (Fig. 15D).

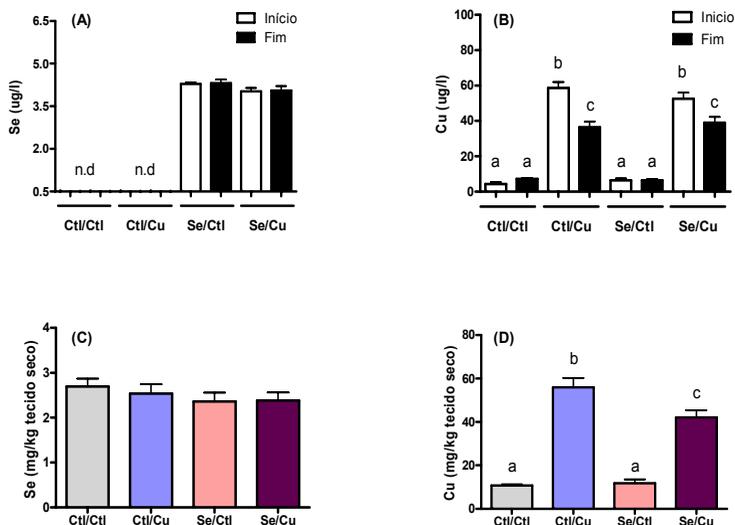


Figura 15: Análises químicas na água e no tecido de mexilhões *Mytilus edulis*. (A) níveis de selênio (Se) na água durante o período de pré-exposição (dias 1-3); (B) níveis de cobre na água durante os dias de exposição (dias 4-6). “Início” representa os valores médios de Se ou Cu na água no início de cada dia, logo após a troca de água; “Fim” representa os valores médios de Se ou Cu na água ao fim de cada dia, antes da próxima troca de água. Níveis de Se (C) e Cu (D) nos tecidos dos mexilhões após 6 dias de experimento. Ctl/Ctl grupo controle; Ctl/Cu animais expostos ao cobre; Se/Ctl animais pré-expostos a selênio; Se/Cu animais pré-expostos a selênio e expostos ao cobre; n.d valores abaixo do limite de detecção (0,5 µg/L). Letras diferentes significam diferenças ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido por teste *post hoc* de Duncan).

5.1.2 Glutaciona total (GSH-t) e tióis protéicos (PSH) em brânquias

O tratamento apenas com Se (Se/Ctl) induziu um aumento nos níveis de GSH-t. Animais pré-expostos a Se e posteriormente expostos a Cu (Se/Cu) também tiveram elevados níveis de GSH-t (Fig. 16A). Exposição ao Cu (Ctl/Cu) causou uma diminuição nos níveis de PSH (Fig. 16B), mas nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de GSH-t (Fig. 16A). Uma interação foi observada entre as exposições [$F(1, 28) = 7.97, p < 0,05$], evidenciada pelos níveis de PSH nos animais pré-tratados com Se e posteriormente com Cu (Se/Cu), os quais retornaram aos valores basais (Ctl/Ctl).

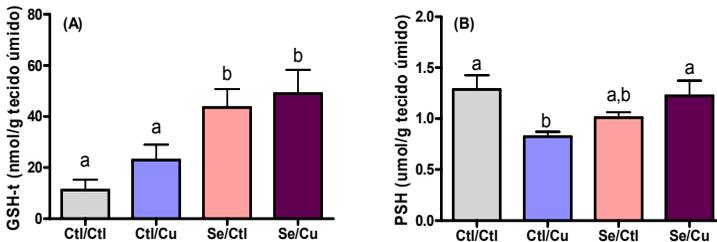


Figura 16: Níveis tiólicos em brânquias de mexilhões *Mytilus edulis* após a exposição à Se e/ou Cu. Níveis de glutaciona total (GSH-t) (A) e tióis protéicos (PSH) (B) após 6 dias de experimento. Ctl/Ctl grupo controle; Ctl/Cu animais expostos ao cobre; Se/Ctl animais pré-expostos a selênio; Se/Cu animais pré-expostos a selênio e expostos ao cobre. Letras diferentes significam diferenças entre os respectivos grupos ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido por teste *post hoc* de Duncan).

5.1.3 Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade enzimática de várias enzimas foram analisadas nas brânquias de *M. edulis* (Fig. 17), incluindo glutaciona peroxidase total (GPx), glutaciona peroxidase dependente de selênio (GPx-Se), catalase (CAT), glutaciona redutase (GR), tioredoxina redutase (TrxR) e glutaciona S-transferase (GST), todas elas possuindo uma ação direta (GPx-t, GPx-Se, CAT) ou indireta (GR, TrxR e GST) nas defesas antioxidantes. Pré-exposição a Se induziu um aumento significativo na

atividade da GPx-Se. Houve também um aumento na atividade da GPx, mas apenas significativo no intervalo de confiança de 90 % ($p=0,07$).

Nenhuma alteração significativa foi observada nas atividades da GPx, GPx-Se, GR, CAT e GST em animais expostos a cobre (grupo Ctl/Cu) (Fig. 17), porém a atividade da TrxR foi diminuída em aproximadamente 60 % quando comparado ao grupo controle (Fig. 17D). Para TrxR, uma interação entre as exposições foi observada no intervalo de confiança de 90 % [$F(1, 29) = 3.29, p < 0.1$].

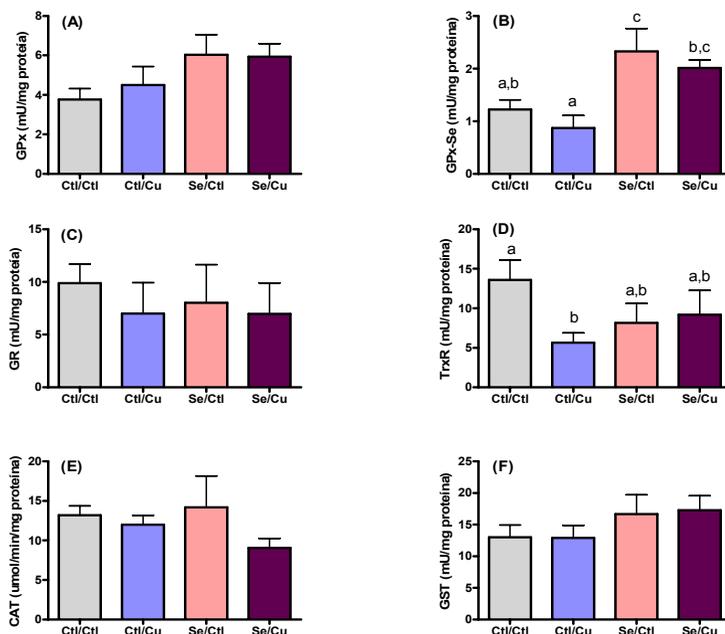


Figura 17: Atividade de enzimas antioxidantes em brânquias de mexilhões *Mytilus edulis* após exposição a Se e/ou Cu. Atividades das enzimas glutatona peroxidase total (GPx) (A); glutatona peroxidase dependente de selênio (GPx-Se) (B); glutatona redutase (GR) (C); tioredoxina redutase (TrxR) (D); catalase (CAT) (E); glutatona S-transferase (GST) (F). Ctl/Ctl grupo controle; Ctl/Cu animais expostos ao cobre; Se/Ctl animais pré-expostos a selênio; Se/Cu animais pré-expostos a selênio e expostos ao cobre; Letras diferentes significam diferenças ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido por teste *post hoc* de Duncan)

O mesmo padrão de aumento da atividade da GPx-Se das brânquias foi observada no plasma da hemolinfa. A atividade permaneceu acima dos níveis do controle mesmo nos animais pré-expostos a Se e expostos a Cu (Fig. 18A). É possível que parte da atividade da GPx-Se encontrada na hemolinfa seja originada da contaminação do músculo adutor, como previamente proposto (AL-SUBIAI *et al.*, 2009). Entretanto, a resposta a exposição a Se foi similar aos resultados da GPx e GPx-Se das brânquias, o que sugere que esta contaminação pode não ter interferido fortemente com os resultados.

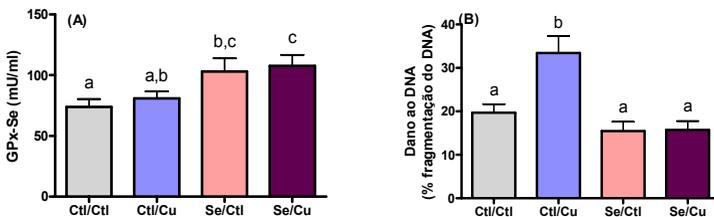


Figura 18: Parâmetros na hemolinfa de mexilhões *Mytilus edulis* após a exposição a Se e/ou Cu. (A) atividade da glutatona peroxidase selênio dependente (GPx-Se) no plasma da hemolinfa; (B) dano no DNA (teste do cometa) em hemócitos. Ctl/Ctl grupo controle; Ctl/Cu animais expostos ao cobre; Se/Ctl animais pré-expostos a selênio; Se/Cu animais pré-expostos a selênio e expostos ao cobre; Letras diferentes significam diferenças ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido por teste *post hoc* de Duncan)

5.1.4 Dano ao DNA estimado pelo teste do cometa

Para melhor compreender os efeitos do cobre nos mexilhões *M. edulis*, o teste do cometa foi realizado nos hemócitos para observar possíveis danos oxidativos no DNA. O cobre causou um aumento no dano ao DNA (Fig. 18B), como observado pelo aumento da porcentagem de cauda de DNA, um indicativo dos níveis de quebras de fita de DNA e sítios álcali-lábeis. A pré-exposição ao Se foi capaz de evitar esse dano induzido pelo cobre nos hemócitos.

5.2 Estudo 2: Análise temporal da exposição à zinco em mexilhões *Perna perna*

5.2.1 Efeitos do zinco sobre o estado tiólico celular

Exposição aguda (2 dias) ao zinco causou depleção dos níveis de tióis celulares nas brânquias de mexilhões *P. perna*. Após 2 e 7 dias de exposição, os níveis de NPSH (Fig. 19A) e GSH-t (Fig. 19B) reduziram entre 30-40%, porém estes valores retornaram aos níveis basais após 21 dias de exposição. Com relação aos níveis de PSH, não foi observada alteração entre 2 e 7 dias, porém após 21 dias de exposição, os níveis estavam mais elevados que os animais controles (Fig. 19C).

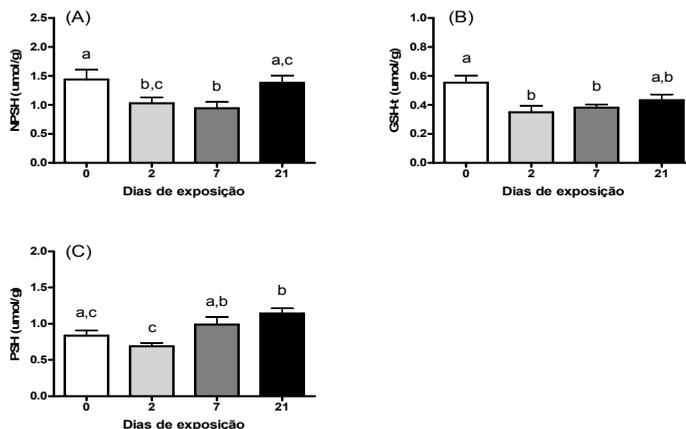


Figura 19: Níveis tiólicos em mexilhões *Perna perna* expostos a zinco por até 21 dias. Níveis de tióis não-protéicos (NPSH) (A); glutatona total (GSH-t) (B); tióis protéicos (PSH) (C). Animais foram expostos a 10 µM de ZnCl₂ durante 2, 7 e 21 dias. Valores representados como média ± EPM (n=9-12). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan).

5.2.2 Efeitos do zinco sobre enzimas antioxidantes

Animais expostos a Zn 10 µM demonstraram diversas alterações no sistema antioxidante. Após 2 dias de exposição, Zn causou redução da atividade GR, porém a atividade voltou ao valor basal em 7 e 21 dias após de exposição (Fig. 20A).

Enquanto nenhuma alteração foi observada após exposição aguda, após 7 e 21 dias a exposição a Zn causou uma resposta coordenada na indução das defesas antioxidantes. As enzimas GPx, SOD e CAT tiveram suas atividades aumentadas após a exposição por 7 ou 21 dias (Fig. 21). Ao mesmo tempo, foi observado um aumento na atividade da TrxR, mas somente após 7 dias (Fig. 20E).

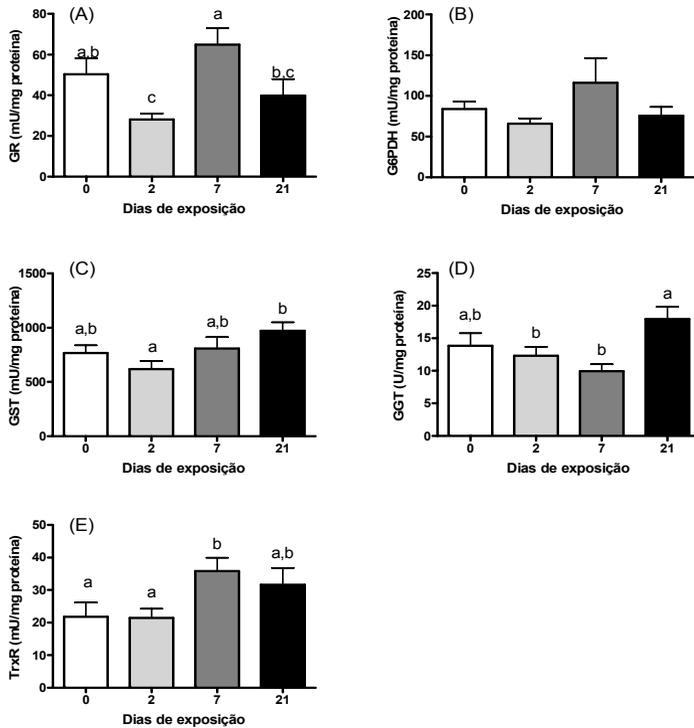


Figura 20: Atividades de enzimas antioxidantes em mexilhões *Perna perna* expostos ao zinco por até 21 dias. Atividade das enzimas glutatona redutase (GR) (A); glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (B); glutatona S-transferase (GST) (C); γ -glutamiltanspeptidase (GGT) (D); tioredoxina redutase (TrxR) (E). Valores representados como média \pm EPM (n=9-12). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan).

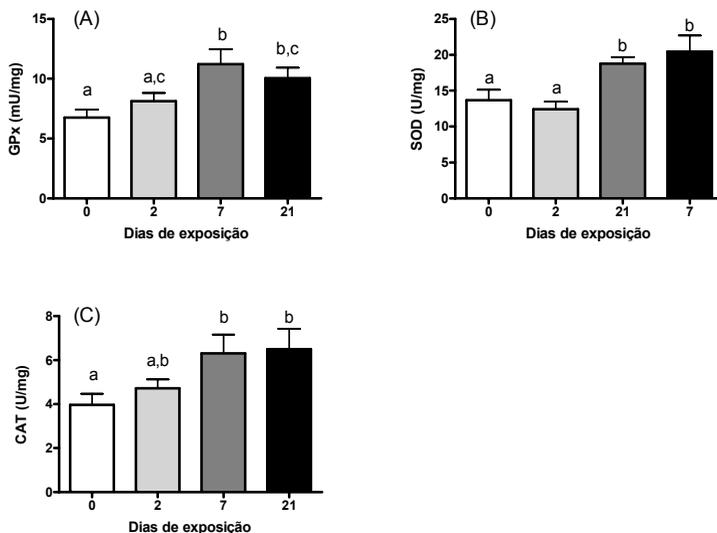


Figura 21: Atividades de enzimas antioxidantes em mexilhões *Perna perna* expostos a zinco por até 21 dias. Atividades da glutathiona peroxidase (GPx) (A); superóxido dismutase (SOD) (B); catalase (CAT) (C). Valores representados como média \pm EPM (n=9-12). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan).

5.2.3 Efeitos do zinco sobre marcadores de estresse oxidativo

Para medir possíveis efeitos do zinco sobre a geração de um cenário pró-oxidativo, marcadores de dano oxidativo a lipídios foram medidos através do método de TBARS. Os níveis de peroxidação lipídica aumentaram após 7 e 21 dias de exposição ao Zn, mas nenhuma alteração foi observada após 2 dias de exposição (Fig. 22A). Os resultados demonstram que os níveis de peróxidos também aumentaram apenas após 7 e 21 dias (Fig. 22B), de modo similar aos níveis de TBARS.

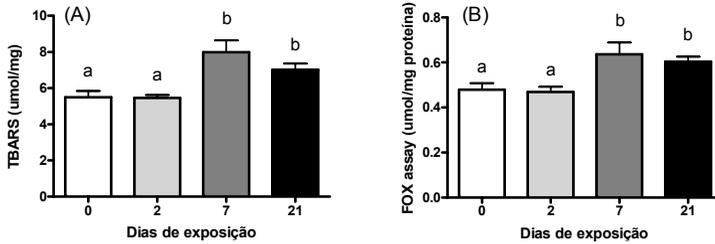


Figura 22: Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em mexilhões *Perna perna* expostos a zinco por até 21 dias. Níveis de (A) produtos finais de peroxidação lipídica medidos pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); (B) peróxidos citosólicos medidos pelo método do PCA-FOX. Valores representados como média \pm EPM (n=9-12). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan)

6. DISCUSSÃO

6.1. Estudo 1: Efeitos protetores do selênio em mexilhões *Mytilus edulis*

6.1.1 Níveis de selênio e cobre na água e nos tecidos

As análises químicas demonstraram que os níveis nominais foram semelhantes aos níveis reais de Se e Cu analisados na água do mar. O Se permaneceu constante na água ao longo do dia e nos tecidos após 3 dias de exposição, indicando que a assimilação foi mínima comparado à quantidade de selênio adicionado à água. Aparentemente, o aumento na disponibilidade de selênio inorgânico não está diretamente relacionado à quantidade de selênio mensurável no tecido (2-3 mg/Kg). Porém, isso não pode ser confirmado por este experimento, uma vez que as brânquias, um importante tecido para acumulação e excreção de contaminantes, foram removidas para análises bioquímicas e, desta forma, não foram incluídas para as análises químicas. Além disso, quando a assimilação de Se é maior que a quantidade necessária para a homeostase celular (e.g. síntese de selenoproteínas), ele é rapidamente excretado como metabólito. A acumulação só ocorre quando a assimilação de Se for maior que a taxa de excreção (BURK, 1986). Uma vez que a concentração de Se utilizada foi muito mais baixa quando comparado com outros estudos toxicológicos (HAMILTON, 2004), é possível que o excesso tenha sido excretado de volta para a água, evitando uma acumulação.

Animais expostos ao cobre incorporaram este metal em seus tecidos causando um aumento de 3-5 vezes comparado aos níveis basais. Este dado está consistente com o fato que os níveis de Cu na água diminuíram entre 30-35% após 24 horas na presença dos animais. Interessantemente, houve uma menor acumulação de cobre no tecido dos mexilhões pré-expostos ao Se (Se/Ctl x Se/Cu) (Fig. 15D). Infelizmente, não foram encontrados estudos na literatura levantando uma possível interferência do Se na assimilação de Cu.

6.1.2. Alterações em parâmetros antioxidantes

Foi demonstrado que o Se leva a um aumento nos níveis de GSH-t (Fig. 15A), mesmo após a exposição ao cobre (grupo Se/Cu). Sabendo que a GSH é um importante neutralizador de ERO, e substrato para

diversas enzimas relacionadas com as defesas antioxidantes (VIARENGO *et al.*, 1993; SIES, 1999), é provável que este aumento na GSH-t seja um dos fatores envolvidos na proteção contra os processos oxidativos mediados pelo cobre. Células tumorais expostas a selenito de sódio (3,2-12,6 $\mu\text{g/L}$) demonstraram aumento nos níveis de GSH celular (KUCHAN *et al.*, 1990), e outros autores (PANEE *et al.*, 2007) demonstraram a superexpressão da selenoproteína H (SelH) humana, uma proteína redox nuclear, induz a transcrição da enzima glutamato-cisteína ligase (GCL), responsável por uma das etapas de síntese de GSH. Se a disponibilidade de Se é capaz de modular os níveis de selenoproteínas em mexilhões, o que foi demonstrado neste estudo no caso da GPx-Se (Fig. 16B), então o aumento nos níveis de GSH pode ser modulado por um mecanismo semelhante a SelH. Independente do mecanismo, um aumento na GSH-t traz duas conseqüências. Primeiro, aumenta a capacidade do organismo de evitar acúmulo de metais, como o cobre, por conjugação e estocagem em lisossomos ou vacúolos, para posterior excreção (VIARENGO *et al.*, 1993). Segundo, maior disponibilidade de glutatona pode aumentar a disponibilidade de substrato, permitindo um maior *turnover* de enzimas que necessitam GSH.

Estudos anteriores demonstraram que o cobre causa diminuição nos níveis de GSH em mexilhões após exposição aguda. Mexilhões de água doce *Unio tumidus* expostos a cobre (30 $\mu\text{g/L}$) tiveram baixos níveis de GSH e altos níveis de GSSG nas brânquias e glândulas digestivas (DOYOTTE *et al.*, 1997). Outro estudo em laboratório demonstrou que exposição ao cobre (60 $\mu\text{g/L}$) por 1 a 3 semanas é capaz de diminuir os níveis de GSH-t nas brânquias e glândula digestiva de duas populações diferentes de *Mytilus galloprovincialis* (REGOLI *et al.*, 1995). Entretanto, recentemente, outro estudo (AL-SUBIAI *et al.*, 2009) encontrou um aumento nos níveis de GSH-t no músculo adutor de *M. edulis* após 5 dias de exposição ao Cu (40 $\mu\text{g/L}$). Interessantemente, apesar da exposição ao cobre (38 $\mu\text{g/L}$) por 7 dias causar uma depleção nos níveis de GSH-t, também observa-se um aumento na atividade da GCL (CANESI *et al.*, 1999). Porém, esse padrão de consumo de glutatona após a exposição ao cobre não foi observado neste presente experimento. Em conjunto, estes dados sugerem que a primeira resposta de mexilhões expostos ao Cu é um aumento na síntese de GSH, e posteriormente, se o nível de estresse oxidativo induzido pelo Cu for alto o suficiente, ocorre oxidação e depleção de GSH.

Os níveis de PSH diminuíram após a exposição ao Cu (Fig. 15B), um sinal evidente de estresse oxidativo. O que poderia estar

correlacionado a um maior consumo de GSH, o qual poderia estar sendo compensado pelo aumento de sua síntese, impedindo a observação de alterações nos níveis de GSH. Cobre pode se ligar a proteínas, particularmente aquelas que contêm tióis, diminuindo a disponibilidade de sua participação em reações de Fenton e Haber-Weiss (LETELIER *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo, a ligação de metais a proteínas pode causar distúrbio na função protéica/enzimática, e em consequência, induzir perda da homeostase celular ou ativar vias de sinalização. Neste contexto, a proteção contra a perda de PSH pela pré-exposição a Se (Fig. 16B) poderia ser explicada por uma maior capacidade desses organismos em neutralizar ERO, devido aos maiores níveis de GSH e de atividade da GPx-Se observados.

6.1.3 Dano ao DNA

Exposição ao cobre causa aumento no dano ao DNA, como observado em eritrócito do peixe *Sparus aurata* e em hemócitos do bivalve *Scapharca inaequivalvis* (GABBIANELLI *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou que mexilhões *M. galloprovincialis* expostos ao cobre (60 µg/L) por dez dias tinham maiores níveis de dano oxidativo no DNA de glândulas digestivas e hemócitos (MACHELLA *et al.*, 2004). Pode ser esperado que a formação catalítica de ERO pelo Cu cause uma resposta antioxidante. O aumento na atividade da GPx-Se nas brânquias e no plasma da hemolinfa; a reversão parcial na inibição da atividade da TrxR; os níveis elevados de GSH e a proteção contra a oxidação de PSH estão de acordo com uma resposta contra a toxicidade do Cu, e podem limitar o aumento nos níveis de ERO, e consequentemente, diminuir os danos celulares mediados pelo cobre.

6.1.4 Selenoproteínas

Muitos estudos têm demonstrado que o tratamento com Se leva a um aumento na atividade de uma ou duas importantes selenoproteínas, GPx-Se e TrxR, em linhagens celulares (EL-BAYOUMY, 2001; HAMILTON, 2004; HOFFMANN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008), peixes (ATENCIO *et al.*, 2009) e invertebrados aquáticos (TRAN *et al.*, 2007). Mesmo assim, o mecanismo de regulação dessas enzimas ainda não foi totalmente elucidado. O aumento na GPx-Se encontrado em *M. edulis* foi similar a outras espécies, mas contrasta com a falta de indução da atividade da TrxR nos animais expostos a Se. Esta resposta diferencial pode estar relacionada com os baixos níveis de Se utilizado

neste estudo, quando comparado com os níveis utilizados em trabalhos com vertebrados.

Um estudo recente com *M. edulis* (TRAN *et al.*, 2007) demonstrou que a suplementação com Se foi capaz de aumentar a atividade GPx-Se na hemolinfa desses animais e impedir os danos no DNA de hemócitos induzido pelo mercúrio. Até onde se sabe, o estudo de Tran *et al.* (2007) e o presente trabalho foram os únicos trabalhos relacionados a proteção de bivalves marinhos contra a toxicidade de metais através da GPx-Se.

A TrxR é uma importante enzima relacionada ao sistema Trx/Prx, responsável pela manutenção dos níveis de Trx reduzida, participando da detoxificação de peróxidos e também de outros processos enzimáticos e regulatórios (ARNER *et al.*, 2000). O conhecimento sobre a TrxR, Trx e Prx em invertebrados é ainda limitado, mas alguns poucos trabalhos demonstraram que a TrxR também tem um papel fundamental na defesa antioxidante do abalone *Haliotis discus discus* contra estresse físico, metais e peróxidos (DE ZOYSA *et al.*, 2008; DE ZOYSA *et al.*, 2009). A redução na atividade da TrxR em animais expostos ao Cu, como demonstrado no presente estudo (Fig. 16D), pode diminuir a eficiência do sistema Trx/Prx através da limitação da taxa de redução da Trx, aumentando a susceptibilidade ao dano oxidativo induzido pelo Cu. Em conjunto, estes dados sugerem que a TrxR (junto com o sistema Trx/Prx) é um interessante parâmetro antioxidante, com potencial promissor em estudos toxicológicos com organismos aquáticos.

Em conjunto (Tabela 2), todos estes resultados sugerem que o Cu pode afetar o metabolismo da glutathione e outras enzimas antioxidantes, gerando um cenário pró-oxidativo e causando dano molecular e celular. Ao mesmo tempo, a exposição ao selênio é capaz modular o sistema antioxidante, amplificando sua defesa contra ERO, as quais são capazes de impedir ou eliminar, ao menos parcialmente, os danos mediados pelo cobre em mexilhões *M. edulis*.

Tabela 2: Resumo dos efeitos antioxidantes do selênio e oxidativos do cobre em mexilhões *Mytilus edulis*.

	Selênio	Cobre	Selênio/cobre
GSH	↑	—	↑
GPx	↑	—	↑
TrxR	—	↓	◇
Dano ao DNA	—	↑	◇
PSH	—	↓	◇

(GSH) níveis glutatona; (GPx-Se) atividade da glutatona peroxidase selênio-dependente; (TrxR) atividade tioredoxina redutase; (PSH) níveis de tióis protéicos. Os tratamentos com selênio e/ou cobre causaram (↓) diminuição, (↑) aumento, (◇) proteção ou (—) nenhuma alteração nos parâmetros avaliados.

6.2 Estudo 2: Análise temporal da exposição à zinco em mexilhões *Perna perna*

Exposição a metais é um assunto extensivamente estudado em vertebrados, especialmente mamíferos, uma vez que eles estão relacionados com diversos processos patológicos. Com relação a invertebrados como bivalves, os estudos de exposição a metais se concentram em análises dos efeitos da contaminação por metais nos ecossistemas aquáticos, mas pouco se sabe sobre os processos bioquímicos e mecanismos regulatórios envolvidos nesses processos.

6.2.1 Estado tiólico celular e glutatona redutase

Zinco causou diversas alterações no sistema antioxidante do mexilhão *Perna perna*, após exposição aguda e sub-crônica. Após 2 dias, o metabolismo da glutatona foi afetado, com baixos níveis de tióis (GSH-t e NPSH) e da atividade da GR. Glutatona é uma importante molécula para a célula, a qual participa de detoxificação e excreção de inúmeros químicos e contaminantes. Consumo de glutatona pela exposição ao zinco também foi observado em outros organismos, como caramujos (RADWAN *et al.*, 2010) e linhagens celulares de mamíferos

(PAVLICA *et al.*, 2009; WISEMAN *et al.*, 2010), possivelmente pela conjugação do zinco com a glutathiona. A glutathiona redutase é uma importante enzima celular, responsável pela ciclagem da GSSG, mantendo-a na sua forma reduzida (GSH). A inibição da GR causada pela exposição ao zinco já foi reportado anteriormente em mexilhões *P. perna* (FRANCO *et al.*, 2006), e pode causar desequilíbrio nas defesas celulares, ou mesmo comprometer a própria célula. Baixos níveis de GSH e da atividade da GR pode ser perigoso para a célula, uma vez que estas estão relacionadas com a capacidade redutora do citosol, protegendo a célula contra processos oxidativos patológicos. Foi demonstrado que a toxicidade do zinco é inversamente proporcional aos níveis celulares de GSH, e sua toxicidade pode ser diminuída através da indução da síntese de GSH em culturas de células (WALTHER *et al.*, 2008). Em um trabalho com células endoteliais de mamíferos (WISEMAN *et al.*, 2010), 4 horas de exposição ao zinco (até 1 mM) foi capaz de consumir os níveis de GSH, inibir a GR e causar uma alteração do estado redox celular do citosol e da mitocôndria, induzindo uma situação de estresse oxidativo e levando à morte celular por apoptose, sem causar um aumento na geração de ERO. Isto demonstra que a disfunção do metabolismo da glutathiona pode afetar a homeostase celular, podendo levar a morte da célula.

Apesar de ter ocorrido um consumo dos tióis, após a exposição aguda, os níveis de NPSH e GSH-t foram restabelecidos aos níveis basais após 21 dias de exposição ao Zn, enquanto os níveis de PSH foram ainda maiores que àqueles do grupo controle (Fig. 18). Essa restauração dos níveis de tióis pode estar relacionada com a síntese de GSH, como um mecanismo compensatório e antagonista à toxicidade do zinco. A enzima GCL, responsável por uma das etapas da síntese de GSH, é regulada positivamente pelo fator de transcrição “fator 2 relacionado ao NF-E2” (Nrf2) em células endoteliais de mamíferos (CORTESE *et al.*, 2008).

6.2.2 Amplificação das defesas antioxidantes

Metais podem regular diversos genes envolvidos na proteção celular e homeostasia de metais, especialmente através da interação com fatores de transcrição (DEMOOR *et al.*, 2000). Sabe-se que o zinco causa a ativação do fator de transcrição dependente de metais (MTF1) através da seqüência gênica de elementos de resposta a metais (ERM), responsável pela regulação da expressão de metalotioneínas, do transportador de zinco (ZnT1), de enzimas de síntese de GSH, entre

outros (ANDREWS, 2001). Este mecanismo poderia levar ao seqüestro e neutralização de zinco através da propriedade quelante da GSH e das metalotioneínas, além da excreção extracelular do zinco pelo ZnT1, conferindo proteção celular adicional contra a toxicidade do zinco. Em um trabalho prévio de nosso grupo com mexilhões *P. perna* (FRANCO *et al.*, 2006), foi demonstrado que a exposição aguda ao zinco causa um aumento na expressão de proteínas chaperonas HSP60 e glicoproteínas-P dependentes de ATP (PgP). As chaperonas podem impedir o malfuncionamento de proteínas e a PgP aumentar a tolerância a metais através da excreção na forma de conjugados de GSH (DEY *et al.*, 1994; BROEKS *et al.*, 1996). Apesar da modulação por Nrf2 e MTF1 não ter sido estudada neste trabalho, é um possível mecanismo de ação, o qual merece futuros estudos em invertebrados aquáticos, uma vez que esse modelo animal é extensamente utilizado em trabalhos de contaminação ambiental por metais.

Experimentos de campo com a truta marrom *Salmo trutta* demonstraram que a exposição a ambientes contaminados por metais (principalmente cádmio, cobre e zinco) causaram um aumento na expressão de genes e no conteúdo de metalotioneínas em brânquias, fígado e rins. A atividade ou a expressão gênica das enzimas SOD, CAT e GPx também foram aumentadas em pelo menos em um dos 3 tecidos analisados (HANSEN *et al.*, 2006). Exposição subcrônica (30 dias) a mercúrio, cobre, chumbo ou cádmio também causaram um aumento na atividade da SOD, ascorbato peroxidase e nos conteúdos de GSH-t do dinoflagelado *Gonyaulax polyedra* (OKAMOTO *et al.*, 2001). Em mexilhões *M. galloprovincialis*, seis dias de exposição a cádmio, cobre, zinco e chumbo causam um aumento na expressão gênica das isoformas 10 e 20 das metalotioneínas (DONDERO *et al.*, 2005). Em conjunto, estes dados demonstram que os metais podem modular a expressão de enzimas antioxidantes e de moléculas quelantes de metais de maneira similar em diferentes organismos

Após a exposição ao zinco por 7 ou 21 dias foi possível observar uma amplificação do sistema antioxidante no mexilhão *P. perna*. O aumento simultâneo nos níveis de GSH-t (Fig. 18), atividade da GPx, CAT, SOD (Fig. 19), TrxR e GR (Fig. 20) pode conferir à célula uma maior proteção contra o estresse oxidativo, e também pode indicar um possível mecanismo de regulação em comum dessas moléculas no mexilhão *P. perna*. Após 21 dias de exposição ao zinco a atividade das enzimas GST e da GGT tenderam a ser maior que os níveis basais ($p=0,09$ e $0,08$ contra o grupo controle, respectivamente), o que reforça a idéia de uma regulação em comum do sistema antioxidante desses

animais. Um trabalho de nosso grupo de pesquisa demonstrou que tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* expostas a ambientes contaminados com metais tiveram uma resposta adaptativa similar, com um aumento mútuo de diversas enzimas antioxidantes e danos em lipídios (FRANCO *et al.*, 2010), reforçando esta idéia. Este mecanismo poderia ser explicado pelo fator de transcrição Nrf2 e a seqüência gênica regulatória elementos de resposta antioxidante (do Inglês ARE), os quais estão relacionados com a regulação da transcrição de enzimas responsáveis pela síntese de GSH, detoxificação de ERO, geradores de NADPH e de detoxificação eletrofílica (ITOH *et al.*, 1999; CHAN *et al.*, 2000). Apesar desta informação ser facilmente aplicada a mamíferos e outros vertebrados, não existem dados disponíveis sobre a expressão/translocação nuclear de Nrf2 e ativação de ARE em invertebrados aquáticos.

6.2.3 Efeitos oxidativos da exposição ao zinco

Com relação aos efeitos tóxicos do zinco aumentando a produção de ERO e induzindo morte ou dano celular, células neuronais expostas a 250 μM de zinco por até 6 horas causaram uma intensa produção de ERO e posteriormente morte celular por necrose (SANCHEZ-MARTIN *et al.*, 2010). Em outro trabalho, neutrófilos humanos expostos a zinco (5-1000 μM) iniciaram um *burst* oxidativo através da ativação da NADPH oxidase e conseqüentemente geração de ânion superóxido (FREITAS *et al.*, 2010), um mecanismo dependente a proteína cinase C. Em um trabalho com o bivalve *Ruditapes decussates*, zinco causou um aumento na CAT e peroxidação lipídica nas brânquias, como resposta a um possível aumento na produção de peróxido de hidrogênio (GERET *et al.*, 2004).

No presente estudo, após 2 dias de exposição, não foram observadas alterações nos níveis de peróxidos e nos índices de peroxidação lipídica (Fig. 21). Entretanto, a exposição subcrônica revelou maiores índices desses parâmetros, possivelmente devido à disfunção mitocondrial e lisossomal, como demonstrado por outros autores. Um trabalho com células humanas demonstrou que zinco causa apoptose e é rapidamente incorporado em lisossomos e mitocôndrias (RUDOLF *et al.*, 2010). Este mesmo trabalho revelou que zinco causa uma diminuição no potencial de membrana da mitocôndria e distúrbios na membrana dos lisossomos, aumento na atividade de caspases, liberação de citocromo c, p53 e outras moléculas pró-apoptóticas para o citosol. Além disto, sabe-se que o zinco causa a inibição do complexo I

da mitocôndria (NADH:ubiquinona oxidoreductase), o que pode causar outras conseqüências patofisiológicas (SHARPLEY *et al.*, 2006).

Em resumo (Tabela 3), estes resultados, em conjunto com descobertas e resultados de outros autores, sugerem que o metabolismo da glutatona é um importante fator de toxicidade do zinco, apesar de não ser um distúrbio permanente para a célula. Como resposta (Fig. 23), a célula pode iniciar importantes vias de sinalização, possivelmente terminando na modulação dos fatores Nrf2 e MTF1, o que irá aumentar a capacidade antioxidante da célula e a maquinaria responsável pela neutralização (GSH e metalotioneínas) e excreção de metais (ZnT1 e PgP). Esta resposta é fundamental para uma proteção mais prolongada: o aumento nas defesas celulares é capaz de restabelecer o balanço tiólico e antioxidante da célula, protegendo o organismo contra os efeitos tóxicos mediados pelo zinco, entretanto esta amplificação nas defesas celulares não foi capaz de impedir o dano aos lipídios, como demonstrado pelo aumento nos níveis de TBARS e de peróxidos.

Tabela 3: Resumo dos efeitos do zinco em parâmetros antioxidantes de *Perna perna* após 2, 7 e 21 dias de exposição.

	Exposição aguda (2d)	Exposição sub-crônica (7 e/ou 21d)
GSH-t NPSH	↓	==
PSH	—	↑
GR	↓	==
TrxR	—	↑
GPx	—	↑
SOD	—	↑
CAT	—	↑
GST/G6PDH/ GGT	—	—
Peróxidos Dano em lipídios	—	↑

Níveis de (GSH-t) glutatona total, (NPSH) tióis não-protéicos, (PSH) tióis protéicos; atividade da (GR) glutatona redutase, (TrxR) tioredoxina redutase, (GPx) glutatona peroxidase, (SOD) superóxido dismutase, (CAT) catalase, (GST) glutatona S-transferase, (G6PDH) glicose-6fosfato desidrogenase, (GGT) γ -glutamil transpeptidase. O exposição ao zinco causou (↓) diminuição, (↑) aumento, (==) retorno aos níveis basais ou (—) nenhuma alteração nos parâmetros avaliados.

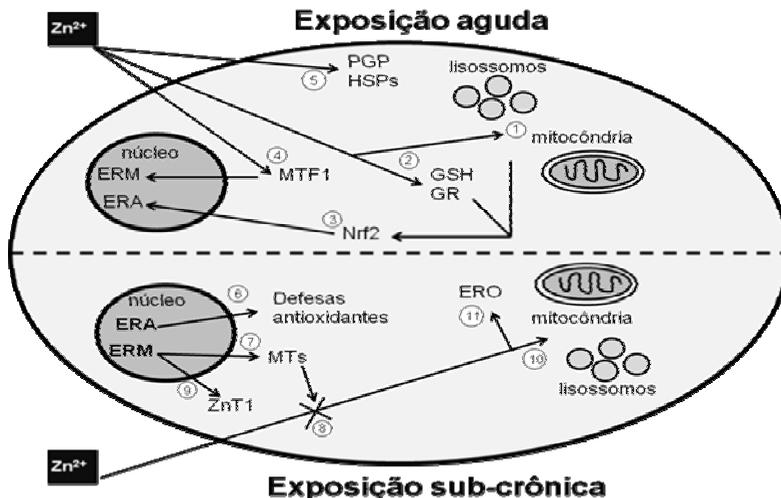


Figura 23: Possível mecanismo de toxicidade do zinco em mexilhões *Perna perna*. No esquema, são propostos dois mecanismos relacionados aos efeitos celulares do zinco (Zn^{2+}): Painel superior representa a exposição aguda (2 dias), enquanto que o inferior a exposição sub-crônica (7-21 dias). *Etapas da exposição aguda:* (1) zinco é assimilado na célula e incorporado na mitocôndria e lisossomos; (2) no citosol, pode afetar o metabolismo da glutatona (GSH), pela inibição da glutatona redutase (GR) ou ligando com a GSH, levando a uma alteração redox na célula; (3) distúrbios em organelas e estresse oxidativo causado pelo zinco podem ativar o fator de transcrição Nrf2, ativando regiões gênicas conhecidas como elementos de resposta antioxidante (ERA); (4) o zinco pode ativar o fator de transcrição dependente de metais (MTF1), o qual liga-se a regiões gênicas conhecidas como elementos de respostas a metais (ERM); (5) o zinco pode também levar a um aumento nos níveis de proteínas de transporte de conjugados de GSH (Pgp) e chaperonas (HSP60), caracterizadas como proteínas de resposta a estresse celular. *Etapas da exposição sub-crônica:* (6) após a indução de ERA por Nrf2 ocorre a síntese de enzimas antioxidantes; (7) após indução de ERM por MTF1 ocorre a síntese de proteínas como metalotioneínas (MTs) as quais irão (8) neutralizar o excesso de zinco citosólico; ERM também é responsável pela (9) síntese de transportadores de zinco (e.g. ZnT1), responsável por excretar o zinco para o meio extracelular; Ainda no meio intracelular, o zinco pode afetar diferentes organelas (10), podendo causar um aumento (11) na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e levar a danos à moléculas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que o sistema antioxidante de mexilhões *M. edulis* é modulado por selênio inorgânico através de um aumento na síntese de GSH e de um aumento na atividade da GPx-Se, possivelmente através de um aumento da transcrição para essa enzima, como observado em outros trabalhos. Uma vez que ambas as moléculas (GSH e GPx-Se) são importantes defesas antioxidantes, e com grande capacidade de degradação de peróxidos, é possível que esses animais possuam uma maior capacidade de detoxificação de EROs, e conseqüentemente, serem mais resistentes ao estresse oxidativo. Essa informação pode ser baseada no fato de que o pré-tratamento com selênio diminui a toxicidade do cobre, um metal cuja toxicidade é mediada por ERO e estresse oxidativo.

O distúrbio no metabolismo da glutathiona também é uma importante via de toxicidade celular. A exposição de mexilhões *P. perna* ao zinco afetou diretamente esse metabolismo, diminuindo a disponibilidade de GSH intracelular e inibindo a GR. Dessa forma, a neutralização direta de ERO pela GSH e as reações acopladas com peroxidases dependentes de tióis (e.g. GPx e Prx6) são diretamente afetadas nessas condições, e a célula torna-se susceptível ao estresse oxidativo. Um interessante mecanismo de regulação do sistema antioxidante foi observado nesses animais após a exposição subcrônica ao zinco, onde foi constatado um aumento na atividade de diversas enzimas antioxidantes e o restabelecimento do estado redox celular. Isso mostra a capacidade de resposta adaptativa desses animais a situações pró-oxidativas, como já foi constatado em estudos com mamíferos. O mecanismo sugerido para essa regulação envolve os fatores de transcrição Nrf2 e MTF-1, os quais são ativados em situações de desbalanço redox e excesso intracelular de metais, respectivamente. Apesar de não ter sido estudado diretamente estas vias de ativação/sinalização, esta área é bastante promissora para trabalhos com invertebrados marinhos.

Além disso, um importante fator constatado em ambos os experimentos é a modulação da TrxR pelo cobre e pelo zinco. Em mamíferos, essa enzima, em conjunto com o sistema Trx/Prx tem sido amplamente estudada, principalmente nas vias de sinalização celular e toxicidade em mitocôndrias. Em bivalves marinhos o conhecimento sobre esse sistema é praticamente nulo, mas os poucos trabalhos com estas moléculas destacaram a sua importância na área de toxicologia aquática.

Este estudo demonstrou fortes evidências da regulação redox de bivalves marinhos em situações de desafios oxidativos, e propôs interessantes modelos de estudo *in vivo* para avaliar os efeitos do metabolismo da glutathione nestes animais. Novos trabalhos ainda são necessários para complementar esse cenário relacionado às diferentes vias de sinalização ativadas/reprimidas nestas situações, e uma abordagem comparativa entre os diferentes grupos de defesas antioxidantes e suas capacidades de detoxificação nestes animais.

PERSPECTIVAS

1. Trabalhar com diferentes sistemas antioxidantes celulares em estados reprimidos/ativados
2. Trabalhar com desafios oxidativos por diferentes agentes (quinonas, peróxidos, metais)
3. Trabalhar com diferentes espécies de bivalves e observar se há diferença de susceptibilidade entre as espécies, e se há relação com diferentes mecanismos de regulação (Fisiologia/Bioquímica comparativa)
4. Causar a inibição de diferentes enzimas antioxidantes ou auxiliares, e observar os efeitos dessas inibições no consumo de peróxido (protocolo em desenvolvimento no laboratório)
5. Estudar possíveis vias de sinalização celular responsável por respostas adaptativas ao estresse oxidativo
6. Observar a importância dos sistemas de degradação de peróxido na questão da morte celular.
7. Investigar o sistema Trx/Prx de bivalves marinhos, através da quantificação e análise de oxidação destas moléculas através do uso de anticorpos específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIYAN, AC; OYEJOLA, TO; ABARIKWU, SO; OYEYEMI, MO; FAROMBI, EO. Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, In Press, (doi:10.1016/j.etp.2009.11.008), 2010.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 121-126, 1984.

AKERBOOM, TP; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**, v.77, p. 373-382, 1981.

AL-SUBIAI, SN; JHA, AN; MOODY, AJ. Contamination of bivalve haemolymph samples by adductor muscle components: implications for biomarker studies. **Ecotoxicology**, v.18, p. 334-342, 2009.

ANDREWS, GK. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. **Biometals**, v.14, p. 223-237, 2001.

ARNER, ES; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p. 6102-6109, 2000.

ARNER, ES; ZHONG, L; HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v.300, p. 226-239, 1999.

ATENCIO, L; MORENO, I; JOS, A; PRIETO, AI; MOYANO, R; BLANCO, A; CAMEAN, AM. Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. **Toxicon**, v.53, p. 269-282, 2009.

BERKHOLZ, DS; FABER, HR; SAVVIDES, SN; KARPLUS, PA. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.382, p. 371-384, 2008.

BERRA, CM; MENCK, CRM; DI MASCIO, P. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. **Química Nova**, v.29, p. 1340-1344, 2006.

BLANCHETTE, B; FENG, X; SINGH, BR. Marine Glutathione S-Transferases. **Marine Biotechnology**, v.9, p.513-542, 2007.

BOLOGNESI, C; LANDINI, E; ROGGIERI, P; FABRI, R; VIARENGO, A. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy

metal effects in mussels: Experimental studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.33, p.287-292, 1999.

BROEKS, A; GERRARD, B; ALLIKMETS, R; DEAN, M; PLASTERK, RHA. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **The Embo Journal**, v.15, p. 6132-6143, 1996.

BURK, RF. Selenium and Cancer - Meaning of Serum Selenium Levels. **Journal of Nutrition**, v.116, p. 1584-1586, 1986.

CANESI, L; VIARENGO, A; LEONZIO, C; FILIPPELLI, M; GALLO, G. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquatic Toxicology**, v.46, p. 67-76, 1999.

CARBALLAL, S; RADI, R; KIRK, MC; BARNES, S; FREEMAN, BA; ALVAREZ, B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. **Biochemistry**, v.42, p. 9906-9914, 2003.

CARLBERG, I; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v.113, p. 484-490, 1985.

CHAN, JY; KWONG, M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. **Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression**, v.1517, p. 19-26, 2000.

CORTESE, MM; SUSCHEK, CV; WETZEL, W; KRONCKE, KD; KOLB-BACHOFEN, V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.44, p. 2002-2012, 2008.

DE ZOYSA, M; LEE, J. Expression profiling of antioxidant and selected immune genes in the gill of disk abalone against thermal, low-salinity and hypoxic stresses. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology**, v.154, p. S6-S6, 2009.

DE ZOYSA, M; PUSHPAMALI, WA; WHANG, S; KIM, SJ; LEE, J. Mitochondrial thioredoxin-2 from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Molecular characterization, tissue expression and DNA protection activity of its recombinant protein. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v.149, p. 630-639, 2008.

DEMOOR, JM; KOROPATNICK, DJ. Metals and cellular signaling in mammalian cells. **Cellular and Molecular Biology**, v.46, p. 367-381, 2000.

DEY, S; PAPADOPOULOU, B; HAIMEUR, A; ROY, G; GRONDIN, K; DOU, D; ROSEN, BP; OUELLETTE, M. High-Level Arsenite Resistance in *Leishmania-Tarentolae* Is Mediated by an Active Extrusion System. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.67, p. 49-57, 1994.

DIZDAROGLU, M; JARUGA, P; BIRINCIOGLU, M; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology and Medicine**, v.32, p. 1102-1115, 2002.

DONDERO, F; PIACENTINI, L; BANNI, M; REBELO, M; BURLANDO, B; VIARENGO, A. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. **Gene**, v.345, p. 259-270, 2005.

DOYOTTE, A; COSSU, C; JACQUIN, MC; BABUT, M; VASSEUR, P. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicology**, v.39, p. 93-110, 1997.

DRAPER, HH; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.186, p. 421-431, 1990.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p. 47-95, 2002.

EL-BAYOUMY, K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.475, p. 123-139, 2001.

ELLMAN, GL. Tissue sulfhydryl groups. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v.82, p. 70-77, 1959.

FERNANDEZ-CHECA, JC; KAPLOWITZ, N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.204, p. 263-273, 2005.

FLOHE, L; HARRIS, JR. **Peroxioredoxin systems: structure and functions**. 1. ed. New York: Springer, 2007. 407p.

FRANCO, JL; POSSER, T; BROCARDO, PS; TREVISAN, R; ULIANO-SILVA, M; GABILAN, NH; SANTOS, ARS; LEAL, RB; RODRIGUES, ALS; FARINA, M; DAFRE, AL. Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the

antidepressant-like effect of zinc in rats. **Behavioural Brain Research**, v.188, p. 316-323, 2008a.

FRANCO, JL; POSSER, T; MATTOS, JJ; SANCHEZ-CHARDI, A; TREVISAN, R; OLIVEIRA, CS; CARVALHO, PSM; LEAL, RB; MARQUES, MRF; BAINY, ACD; DAFRE, AL. Biochemical alterations in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) exposed to zinc: Glutathione reductase as a target. **Marine Environmental Research**, v.66, p. 88-89, 2008b.

FRANCO, JL; TREVISAN, R; POSSER, T; TRIVELLA, DB; HOPPE, R; MARTINS ROSA, J; FERNANDES DINSLAKEN, D; DECKER, H; INES TASCA, C; BAINY LEAL, R; FREIRE MARQUES, MR; DIAS BAINY, AC; LUIZ DAFRE, A. Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Saf**, v.73, p. 864-872, 2010.

FRANCO, JL; TRIVELLA, DBB; TREVISAN, R; DINSLAKEN, DF; MARQUES, MRF; BAINY, ACD; DAFRE, AL. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p. 232-240, 2006.

FREDERICKSON, CJ; SUH, SW; SILVA, D; FREDERICKSON, CJ; THOMPSON, RB. Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 1471s-1483s, 2000.

FREITAS, M; PORTO, G; LIMA, JLFC; FERNANDES, E. Zinc activates neutrophils' oxidative burst. **Biometals**, v.23, p. 31-41, 2010.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.64, p. 97-112, 1995.

GABBIANELLI, R; LUPIDI, G; VILLARINI, M; FALCIONI, G. DNA damage induced by copper on erythrocytes of gilthead sea bream *Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequalvis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.45, p. 350-356, 2003.

GAY, CA; GEBICKI, JM. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. **Analytical Biochemistry**, v.304, p. 42-46, 2002.

GERET, F; BEBIANNO, MJ. Does zinc produce reactive oxygen species in *Ruditapes decussatus*? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p. 399-409, 2004.

GLOCK, GE; MC, LP. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemistry Journal**, v.55, p. 400-408, 1953.

HABIG, WH; JAKOBY, WB. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v.77, p. 398-405, 1981.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. **Free Radical in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 704p.

HAMILTON, SJ. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. **Science of the Total Environment**, v.326, p. 1-31, 2004.

HANSEN, BH; ROMMA, S; GARMO, OA; OLSVIK, PA; ANDERSEN, RA. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v.143, p. 263-274, 2006.

HARDY, RW; ORAM, LL; MOLLER, G. Effects of Dietary Selenomethionine on Cutthroat Trout (*Oncorhynchus clarki bouvieri*) Growth and Reproductive Performance Over a Life Cycle. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, p. 237-245, 2010.

HAYES, JD; FLANAGAN, JU; JOWSEY, IR. GLUTATHIONE TRANSFERASES. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.51-88, 2005.

HOFFMANN, PR; HOGE, SC; LI, PA; HOFFMANN, FW; HASHIMOTO, AC; BERRY, MJ. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. **Nucleic Acids Research**, v.35, p. 3963-3973, 2007.

IMLAY, JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review of Biochemistry**, v.77, p. 755-776, 2008.

ITO, K; WAKABAYASHI, N; KATOH, Y; ISHII, T; IGARASHI, K; ENGEL, JD; YAMAMOTO, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes & Development**, v.13, p. 76-86, 1999.

KENSLER, TW; WAKABAYASHI, N; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v.47, p. 89-116, 2007.

KIM, YH; KIM, EY; GWAG, BJ; SOHN, S; KOH, JY. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis, mediation by free radicals. **Neuroscience**, v.89, p. 175-182, 1999.

KIM, YS; KIM, SM; HAN, S. Nitric Oxide Converts Catalase Compounds II and III to Ferricatalase. **Bulleting of the Korean Chemical Society**, v.23, p. 1664-1666, 2002.

KUCHAN, MJ; FICO SANTORO, M; MILNER, JA. Consequences of selenite supplementation on the growth and metabolism of cultures of canine mammary cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.1, p. 478-483, 1990.

KUMARAVEL, TS; JHA, AN. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research**, v.605, p. 7-16, 2006.

LAWRENCE, RA; BURK, RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.71, p. 952-958, 1976.

LETELIER, ME; LEPE, AM; FAUNDEZ, M; SALAZAR, J; MARIN, R; ARACENA, P; SPEISKY, H. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v.151, p. 71-82, 2005.

LOW, FM; HAMPTON, MB; WINTERBOURN, CC. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. **Antioxidand and Redox Signalling**, v.10, p. 1621-1630, 2008.

MACHELLA, N; REGOLI, F; CAMBRIA, A; SANTELLA, RM. Application of an immunoperoxidase staining method for detection of 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine as a biomarker of chemical-induced oxidative stress in marine organisms. **Aquatic Toxicology**, v.67, p. 23-32, 2004.

MACKENZIE, GG; KEEN, CL; OTEIZA, PI. Reductions in the expression of NF-kappa B-driven genes contribute to zinc deficient neuronal pathologies. **Faseb Journal**, v.19, p. A1498-A1498, 2005.

MARÍ, M; MORALES, A; COLELL, A; GARCÍA-RUIZ, C; FERNÁNDEZ-CHECA, JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. **Antioxidant and Redox Signalling**, v.11, p.2685-2700, 2009.

MEISTER, A. Enzymology of Amino-Acid Transport. **Science**, v.180, p. 33-39, 1973.

NORDBERG, J; ARNER, ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p. 1287-1312, 2001.

OKAMOTO, OK; PINTO, E; LATORRE, LR; BECHARA, EJH; COLEPICOLO, P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.40, p. 18-24, 2001.

OWENS, CWI; BELCHER, RV. A Colorimetric Micro-Method for Determination of Glutathione. **Biochemical Journal**, v.94, p. 705-711, 1965.

PANEE, J; STOYTICHEVA, ZR; LIU, W; BERRY, MJ. Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p. 23759-23765, 2007.

PAVLICA, S; GAUNITZ, F; GEBHARDT, R. Comparative in vitro toxicity of seven zinc-salts towards neuronal PC12 cells. **Toxicology in Vitro**, v.23, p. 653-659, 2009.

RADWAN, MA; EL-GENDY, KS; GAD, AF. Oxidative Stress Biomarkers in the Digestive Gland of *Theba pisana* Exposed to Heavy Metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, p. 828-835, 2010.

RAMAKRISHNAN, S; RAJESH, M; SULOCHANA, KN. Eales' disease: oxidant stress and weak antioxidant defence. **Indian Journal of Ophthalmology**, v.55, p. 95-102, 2007.

RAYMAN, MP. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v.356, p. 233-41, 2000.

REGOLI, F; GORBI, S; FRENZILLI, G; NIGRO, M; CORSI, I; FOCARDI, S; WINSTON, GW. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**, v.54, p. 419-423, 2002.

REGOLI, F; PRINCIPATO, G. Glutathione, Glutathione-Dependent and Antioxidant Enzymes in Mussel, *Mytilus-Galloprovincialis*, Exposed to Metals under Field and Laboratory Conditions - Implications for the Use of Biochemical Biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v.31, p. 143-164, 1995.

REID, TJ3RD; MURTHY, MR; SICIGNANO, A; TANAKA, N; MUSICK, WD; ROSSMANN, MG. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.78, p. 4767-4771, 1981.

REISCHL, E; DAFRE, AL; FRANCO, JL; WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v.146, p. 22-53, 2007.

REN, XJ; GAO, SJ; YOU, DL; HUANG, HL; LIU, Z; MU, Y; LIU, JQ; ZHANG, Y; YAN, GL; LUO, GM; YANG, TS; SHEN, JC. Cloning and expression of a single-chain catalytic antibody that acts as a

glutathione peroxidase mimic with high catalytic efficiency. **Biochemical Journal**, v.359, p. 369-374, 2001.

RUDOLF, E; CERVINKA, M. Zinc pyrithione induces cellular stress signaling and apoptosis in Hep-2 cervical tumor cells: the role of mitochondria and lysosomes. **Biometals**, v.23, p. 339-354, 2010.

RUPERT, EE; BARNES, RD. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca, 1996. 1074 p.

SANCHEZ-MARTIN, FJ; VALERA, E; CASIMIRO, I; MERINO, JM. Nerve growth factor increases the sensitivity to zinc toxicity and induces cell cycle arrest in PC12 cells. **Brain Research Bulletin**, v.81, p. 458-466, 2010.

SHARPLEY, MS; HIRST, J. The inhibition of mitochondrial complex I (NADH : ubiquinone oxidoreductase) by Zn²⁺. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p. 34803-34809, 2006.

SHELINE, CT; BEHRENS, MM; CHOI, DW. Zinc-induced cortical neuronal death: Contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. **Journal of Neurosciences**, v.20, p. 3139-3146, 2000.

SHI, DL; WANG, WX. Modification of trace metal accumulation in the green mussel *Perna viridis* by exposure to Ag, Cu, and Zn. **Environmental Pollution** v.132, p. 265-277, 2004.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radicals Biology and Medicine**, v.27, p. 916-921, 1999.

SIES, H; MOSS, KM. Role of Mitochondrial Glutathione Peroxidase in Modulating Mitochondrial Oxidations in Liver. **European Journal of Biochemistry**, v.84, p. 377-383, 1978.

SLEKAR, KH; KOSMAN, DJ; CULOTTA, VC. The yeast copper zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p. 28831-28836, 1996.

SMART, RC; HODGSON, E. **Molecular and Biochemical Toxicology**. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008. 948p.

STADTMAN, ER; LEVINE, RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v.25, p. 207-218, 2003.

STEINBRENNER, H; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochim Biophys Acta**, v.1790, p. 1478-1485, 2009.

TATEISHI, N; HIGASHI, T; NARUSE, A; NAKASHIMA, K; SHIOZAKI, H; SAKAMOTO, Y. Rat-Liver Glutathione - Possible Role as a Reservoir of Cysteine. **Journal of Nutrition**, v.107, p. 51-60, 1977.

TRAN, D; MOODY, AJ; FISHER, AS; FOULKES, ME; JHA, AN. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. **Aquatic Toxicology**, v.84, p. 11-18, 2007.

VIARENGO, A; NOTT, JA. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v.104, p. 355-372, 1993.

WALTHER, UI; WALTHER, SC; MUCKTER, H; FICHTL, B. Enhancing glutathione synthesis can decrease zinc-mediated toxicity. **Biological Trace Element Research**, v.122, p. 216-228, 2008.

WANG, HW; XU, HM; XIAO, GH; ZHAO, CL; WANG, ZH; CAI, DB; LI, HQ; ZHAO, JH. Effects of Selenium on the Antioxidant Enzymes Response of Neocaridina heteropoda Exposed to Ambient Nitrite. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.84, p. 112-117, 2010.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymol**, v.77, p. 325-333, 1981.

WHITFIELD, JB. Gamma glutamyl transferase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Science**, v.38, p. 263-355, 2001.

WINTERBOURN, CC; STERN, A. Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. **Journal of Clinical Investigations**, v.80, p. 1486-1491, 1987.

WISEMAN, DA; SHARMA, S; BLACK, SM. Elevated zinc induces endothelial apoptosis via disruption of glutathione metabolism: role of the ADP translocator. **Biomaterials**, v.23, p. 19-30, 2010.

WOJEWODA, M; DUSZYNSKI, J; SZCZEPANOWSKA, J. Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: Effect of selenium. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v.1797, p.890-896, 2010.

WONG, CKC; CHEUNG, RYH; WONG, MH. Heavy metal concentrations in green-lipped mussels collected from Tolo Harbour and markets in Hong Kong and Shenzhen. **Environmental Pollution**, v.109, p. 165-171, 2000.

WOOD, ZA; POOLE, LB; KARPLUS, PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v.300, p. 650-653, 2003.

YU, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p. 139-162, 1994.

ZHANG, JS; WANG, HL; PENG, DG; TAYLOR, EW. Further insight into the impact of sodium selenite on selenoenzymes: High-dose selenite enhances hepatic thioredoxin reductase 1 activity as a consequence of liver injury. **Toxicology Letters**, v.176, p. 223-229, 2008.