
Utilização de biomarcadores de estresse oxidativo no monitoramento ambiental

MONIQUE CRISTINE DE OLIVEIRA(G-UNINGÁ)¹
VITOR HUGO ENUMO DE SOUZA(UNINGÁ)²

RESUMO: A exposição de um organismo a um poluente resulta primeiramente no acúmulo desse xenobiótico nos órgãos e tecidos e alterações moleculares irreversíveis podem ocorrer devido à contínua ação deletéria. Um dos efeitos provocados pelos metais pesados é sua capacidade de catalisar reações oxidativas, levando à geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS). Existe uma variedade de defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, que controlam a formação excessiva das EROs. Das defesas enzimáticas destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), enquanto que os compostos tais como o GSH (glutatona reduzida) fazem parte do sistema de defesa não enzimático celular. Sendo assim, os testes de avaliações de impacto ambiental utilizando-se os níveis das defesas antioxidantes mostram-se cada vez mais úteis e necessário para que, através da investigação, possam se desenvolver metodologias para acabar, ou ao menos diminuir, o impacto ambiental ocasionado por xenobióticos.

Palavras-chave: Biomonitoramento. Biomarcadores. Estresse oxidativo.

ABSTRACT: The irreversible exposition of an organism to a pollutant result first in the accumulation of this xenobiótico in the agencies and fabrics and molecular alterations can occur due to continuous deleterious action. One of the effect provoked for metals heavy is its capacity to catalyze oxidativas reactions, leading to the generation of Reactive Species of Oxigênio (EROS). A variety of antirust, enzymatic and not enzymatic defenses exists, that control the extreme formation of the

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Faculdade Ingá – UNINGÁ

² Professor Mestre Faculdade Ingá – UNINGÁ

EROs. Of the enzymatic defenses the enzymes are distinguished superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), while that the composites such as the GSH (glutathione reduced) are part of the system of cellular not enzymatic defense. Being thus, the tests of evaluations of ambient impact using the levels of more useful the antioxidant defenses reveal each necessary time and so that, through the inquiry, methodologies can be developed to finish, or to little diminishing, the ambient impact caused by xenobiotics.

Key words: Biomonitoramento. Biomarcadores. Oxidativo Estresse

INTRODUÇÃO

A ação antropogênica tem aumentado igualmente as oscilações do ambiente aquático, permitindo a liberação indiscriminada de agentes poluidores, como agrotóxicos, efluentes industriais e municipais, substâncias eutrofizantes, entre outros (ARAÚJO et al., 2001). A contaminação dos vários ambientes por meio da interferência antrópica, resulta em conseqüências muitas vezes irreversíveis para os biomas que habitam estes ambientes. Para combater este problema, é necessário o conhecimento das causas e efeitos dos poluentes.

A principal característica dos ecossistemas aquáticos é a complexa interação entre os fatores físicos, químicos e biológicos, motivo pelo qual se torna necessário conhecer o relacionamento entre os componentes do sistema para compreender sua resposta a uma substância xenobiótica (LEMOS; TERRA, 2003). Os impactos causados por agentes tóxicos no ambiente e na saúde humana muitas vezes não podem ser observados e medidos diretamente. A informação obtida nas análises de risco nos permitem estimar e comparar estes impactos (SILVA; FONSECA, 2003; LEMOS; TERRA, 2003).

Bioindicadores, também conhecidos por organismos sentinela, vem sendo utilizados há muito tempo no que diz respeito a alertar as pessoas sobre ambientes perigosos. Biomarcadores são igualmente úteis. Eles podem ser definidos como sistemas (bioquímicos/fisiológicos/histológicos) indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificar processos de sensibilização ou de toxicidade como função de condições ambientais adversas (SILVA et al., 2003).

O conceito básico que sustenta a utilização de biomarcadores de poluição ambiental se baseia no fato de que os distúrbios causados por

xenobióticos no meio ambiente levam inicialmente a uma perturbação comportamental, fisiológica, bioquímica ou estrutural em um determinado organismo. Se estas alterações forem observadas com uma certa antecedência, pode ser possível identificar problemas ambientais antes que o ecossistema aquático seja afetado como um todo (JIMENEZ; STEGEMAN, 1990).

Todos os organismos vivos estão em interação com o meio ambiente. Assim, o seu genoma fica exposto às interferências que esse meio sofre. A interação entre o meio e o organismo resulta em modificações que, quando positivas, refletem na adaptação do organismo quanto à melhor exploração desse meio, o que decorre também na própria modificação do ambiente pelo organismo (MINISSI; LOMBI, 1997; PASCALICCHIO, 2002).

Muitos dos poluentes que são despejados nos mananciais hídricos podem potencialmente induzir estresse oxidativo em organismos aquáticos incluindo os peixes. Embora a poluição aquática seja responsável pela produção do estresse oxidativo, através do ciclo redox dos poluentes, mesmo sem poluição ou biotransformação dos xenobióticos, há uma constante produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nos sistemas vivos (WILHELM FILHO et al., 2001).

DESENVOLVIMENTO

As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos (MEAGHER; FITZGERALD, 2000). Dentre os processos de oxidação induzidos por radicais livres, a lipoperoxidação (LPO) ou peroxidação lipídica, é, provavelmente, o processo mais extensivamente investigado. A presença abundante de fosfolipídios de membranas faz desses compostos alvos endógenos facilmente acessíveis ao ataque dos radicais livres formados, especialmente as EROs. Principalmente os ácidos graxos poliinsaturados são o grupo de lipídeos mais facilmente susceptíveis às reações com os radicais livres. A LPO pode levar à formação de radicais livres em cadeia (ZWART et al., 1999).

As conseqüências mais comuns da LPO envolvem a perturbação da função das membranas das células e organelas essenciais. Isto inclui o processo de transporte, a manutenção do gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (MEAGHER; FITZGERALD, 2000).

A determinação das espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é uma medida indireta do processo de oxidação que ocorre nos lipídios das membranas celulares, principalmente nos ácidos graxos poliinsaturados por serem mais susceptíveis ao ataque oxidativo das EROs. Dentre os peróxidos de lipídeos formados, que reagem com o TBA, destaca-se o malondealdeído, embora outros compostos como açúcar, aminoácidos e bilirrubina podem reagir também com o TBA (MEAGHER; FITZGERALD, 2000).

A despeito dos danos oxidativos que podem ocorrer nas membranas celulares e no material genético como resultado da formação de radicais livres, nos sistemas vivos existe uma variedade de defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, que controlam a formação excessiva das EROs. Das defesas enzimáticas merecem destaque as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), enquanto que os compostos tais como, α -tocoferol (principal componente da vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) GHS (glutathione reduzida) fazem parte do sistema de defesa não enzimático celular (CÓRDOBA-PEDREGOZA et al., 2003).

A SOD é uma metaloenzima considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das EROs, pois são responsáveis pela conversão do O_2^- em H_2O_2 e O_2 . Existem três tipos distintos de SODs, cada qual possuindo um metal específico no sítio ativo. A SOD que contém manganês (MnSOD) é encontrada em bactéria e certas organelas (mitocôndria e cloroplastos) de organismos superiores. A SOD que possui cobre e zinco no seu sítio ativo (CuZnSOD), está presente principalmente, no citosol de eucariontes e cloroplastos de plantas superiores. E finalmente, a SOD que contém ferro (FeSOD) é encontrada em bactérias e algumas plantas superiores (SOARES et al, 2000).

Dois tipos de enzimas podem remover o peróxido de hidrogênio da célula, são elas a CAT e a GPx. A maioria das células aeróbias possui CAT, com exceção de algumas bactérias. Nos animais, essa enzima está presente na maioria dos órgãos, mas concentra-se principalmente, no fígado e nos eritrócitos. Ela é composta de quatro subunidades protéicas, cada uma contendo um grupo heme (Fe(III)-protoporfirina) ligado ao sítio ativo. A cada subunidade da enzima existe uma molécula de NADPH ligada, que tem por função ajudar na estabilização da estrutura enzimática (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). As catalases funcionam então como canal de limpeza do H_2O_2 celular (BREUSEGEM et al. 2001).

Embora as glutathione S-transferases (GST) atuem também diretamente contra as EROs, elas são uma das mais importantes enzimas da fase II de biotransformação. Esta superfamília de enzimas, presente principalmente no citosol, catalisa reações de conjugação de uma variedade de xenobióticos, bem como, de substratos endógenos com a glutathione (LÓPEZ et al., 2002).

Estas enzimas estão envolvidas no transporte de compostos lipofílicos endógenos e exógenos resultantes da fase I do metabolismo. Elas são capazes de formar ligações covalentes com epóxidos ativos derivados das reações da fase I de biotransformação, impedindo que os mesmos se liguem ao DNA ou a outras biomoléculas (DI GIULIO et al., 1995).

As GSTs têm sido extensivamente estudadas em organismos superiores, especialmente em mamíferos. Mas durante os últimos anos tem crescido o interesse de pesquisar essas isoformas em organismos aquáticos, com o objetivo de serem utilizadas como biomarcadores específicos de certos agentes químicos (OOST et al., 1996).

Durante o processo de combate do estresse oxidativo ocorre a redução do peróxido de hidrogênio bem como de peróxidos orgânicos. Esse processo envolve a concomitante oxidação da GSH para a glutathione oxidada (GSSG), a qual pode ser reduzida pela glutathione reductase oxidando o NADPH (AHMAD et al., 2005).

A GSH, um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol celular não protéico associado com uma variedade de funções celulares, tais como integridade do citoesqueleto, síntese de proteína e de DNA, transporte de aminoácidos, “scavenger” de radicais livres, transdução de sinais, cofator de enzimas essenciais e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente perigosos (PEÑA et al., 2000).

Além da utilização dos biomarcadores de defesa antioxidante e de dano oxidativo (LPO e dano ao DNA), outros biomarcadores têm sido empregados no monitoramento da poluição por metais. A inibição da atividade da enzima delta aminolevulínico desidratase (ALA-D) tem sido relacionada com a exposição por metais pesados. A ALA-D é uma metaloenzima que requer íons zinco para sua atividade normal. Ela apresenta grupamentos sulfídricos na sua estrutura e sua atividade é altamente sensível à presença de alguns metais pesados como mercúrio, chumbo e outros compostos que podem oxidar grupamentos sulfídricos (VIEIRA et al., 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As EROs podem potencialmente atacar qualquer estrutura celular ou molécula. Contudo, com respeito ao envelhecimento e câncer, o DNA é considerado o principal alvo de ataque. A modificação oxidativa das bases do DNA pode resultar em mutação, ao passo que a oxidação das unidades de desoxirribose pode induzir à liberação de bases ou quebra nas fitas de DNA (ZWART et al., 1999).

A alteração nas defesas antioxidantes representa um mecanismo de defesa celular para combater a toxicidade das EROs e que tem sido muito usado em vários estudos para determinar a toxicidade dos poluentes (WILHELM FILHO, 1997). A GSH é o principal tiol não protéico associado a uma variedade de funções celulares. Dentre essas funções, duas estão envolvidas na detoxificação, como na conjugação com intermediários eletrofílicos, principalmente via atividade da GST na fase II da biotransformação e participando como um importante antioxidante pela neutralização direta, não enzimática de metabólitos reativos (GALLAGHER; DI GIULIO, 1992.).

As GSTs têm sido reportadas como biomarcadores para avaliar o impacto ambiental de compostos orgânicos que geram estresse oxidativo, além de estarem envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos reativos (DI GIULIO et al., 1995).

Durante o ataque das EROs ao DNA poderia haver oxidação das bases do DNA e quebras de fita simples e dupla na molécula (ZWART et al., 1999). Nas duas últimas décadas houve um grande desenvolvimento na pesquisa de novas metodologias para a determinação de danos ao DNA. Em 2003, Pandey e colaboradores aumentaram a sensibilidade de detecção do dano em células isoladas ao desenvolverem uma técnica de eletroforese em microgel, que ficou conhecida como teste Cometa. Modificações dessa técnica permitiram a detecção de quebras de fita dupla devido à condição neutra da eletroforese e, subsequente, foi possível a detecção de quebras de fita simples usando uma condição alcalina para a eletroforese (ROJAS et al., 1999).

A preservação do meio ambiente e a prevenção dos efeitos danosos causados pelo seu uso não apropriado são uma preocupação cada vez maior no mundo atual. Da preservação do ambiente dependem não apenas as gerações futuras mas também, a geração atual, que vai gerar as posteriores. Não é apenas um desenvolvimento sustentável que deve ser levado em consideração na manutenção do clima e solo e

conseqüentemente das espécies viventes. A utilização cada vez mais acentuada de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros, tem demonstrado estar causando um aumento nas taxas de mutagênese ambiental. Assim, a poluição do ambiente em que vivemos, por produtos mutagênicos, afeta a atual e próximas gerações, não apenas a humana, mas também a de plantas, animais e microrganismos. Sendo assim, os testes de avaliações de impacto ambiental utilizando-se os parâmetros de danos oxidativos mostram-se cada vez mais úteis e necessários, para que, através da investigação possam se desenvolver metodologias para acabar, ou ao menos diminuir, o impacto ambiental ocasionado por xenobióticos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; FATIMA, R.A. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment* 346: 256 – 273, 2005.
- ARAÚJO, E.J.A. et al. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Acta Scientiarum* 23(2): 391-399, 2001.
- BREUSEGEM, F.V. et al. The role of active species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405 – 414, 2001.
- CÓRDOBA-PEDREGOZA, M.C. et al. Zonal changes in ascorbato and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbato-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiology*, v. 131, pp. 697-706. 2003.
- DI GIULIO, R. T. et al. A biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: **Fundamentals of aquatic toxicology effects, environmental Fate, and Risk Assessment**. RAND, G. M. (ed.) 2.ed. Taylor & Francis, 1995.
- GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. A comparasion of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 102, p. 543-547, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 1989.

JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. Detoxication enzymes as indicators of environmental stress on fish. *American Fisheries Society Symposium*, v.8, p.67-79, 1990.

LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. Poluição: causas, efeitos e controle. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

LÓPEZ, M.P.; VALINÁS, C.N.; RIOL, M.J.M. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. *Toxicology Letters*, v. 136, p. 97-106, 2002.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 202-226, 2000.

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by Vicia faba micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat. Res.*, v.39, p. 317-321. 1997.

OOST, R. et al. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical response. *Aquatic Toxicology*, v. 36, p. 189-222, 1996.

PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The Science of the Total Environment*, v. 309, p. 105-115, 2003.

PASCALICCHIO, A.E. **Contaminação por metais pesados**. São Paulo: Annablume, 2002.

PEÑA S. et al. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 46, p. 51-56, 2000.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, v. 722, p. 225-254, 1999.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p. 70-84, 2003.

SILVA, M.F.P.T.B. et al. Mutagenic Effect of Fresh Water (well, rivers Ficha and Minas Gerais, close to the town of Ubiratã PR Brazil) in the Animal Test System. *Acta Scientiarum*, Brasil, v. 25, n. 2, 2003.

SOARES, C. H. L.; BAPTISTA, I.E.; MOISMANN, A. L. P. Estudo comparativo da toxicidade de efluentes de Indústria de Papel e Celulose utilizando parâmetros bioquímicos. **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI**. São Carlos: Rima, 2000.

VIEIRA, V. L. P. et al. Effect of aluminium on δ -aminolevulinic acid dehydratase from mouse blood. *Toxicology Letters*, v. 117, p. 45-52, 2000.

WILHELM FILHO, D. et al. **The effect of pulp mill effluent on two fish species**. Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. Curitiba: PR, p.612 – 619, 1997.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses- a comparative approach. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.29, p.1735-1742, 2001.

ZWART, L. L. et al. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 202-226, 1999.

