



ALTERAÇÕES OXIDATIVAS EM CÉREBRO DE *LEPORINUS MACROCEPHALUS* EXPOSTOS A HIPÓXIA.

Riffel, A. P. K.

Finamor, I. A.; Saccol, E. M. H.; Garcia, L. O.; Mattiazzi, J.; Llesuy, S. F.; Baldisserotto, B.; Pavanato, M. A.;

Universidade Federal de Santa Maria; anapkr@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os níveis de oxigênio são um fator fundamental à vida aeróbica, que afeta diretamente a distribuição dos ectotermos, principalmente os peixes (Lushchak e Bagnyukova, 2007). Em ambientes aquáticos, fatores como a decomposição da matéria orgânica, interferência antropogênica através da adição de nutrientes e altas temperaturas diminuem os níveis de oxigênio presentes na água, levando a condições hipóxicas (Sampaio *et al.*, 2007). Situações como a acima citada podem alterar os níveis das defesas celulares nos organismos presentes nesse meio.

Apesar de ser essencial a vida aeróbia, o oxigênio também pode causar efeitos tóxicos nestes organismos, através da formação das Espécies Reativas de Oxigênio (EAO). Devido a isso, alguns seres vivos, como peixes e mamíferos, desenvolveram um amplo sistema de defesa antioxidante, com componentes enzimáticos e não enzimáticos, os quais podem atuar de forma distinta nos diferentes órgãos de um indivíduo (Pavanato e Llesuy, 2008).

Algumas situações ambientais levam a desequilíbrios entre a produção de EAO, também chamadas pró - oxidantes, e as taxas de antioxidantes. Caso essa produção exceda, e ocorra uma redução nos antioxidantes, caracteriza - se a condição de estresse oxidativo, que origina danos celulares (Sampaio, *et al.*, 2007. Sies, 1993).

A família Anostomidae, pertencente à ordem Characiformes, apresenta 12 gêneros presentes na América do Sul e Central. Destaca-se entre eles o gênero *Leporinus*, pela ampla distribuição geográfica e grande número de espécies descritas, além de ocorrerem em grande quantidade nos rios e reservas de hidrelétricas (Ribeiro *et al.*, 2001).

Leporinus Macrocephalus, conhecido popularmente como piauçu ou piaçu, é a espécie que atinge maior porte entre as espécies de Anostomidae, chegando a atingir 60 cm. Distribuída pela bacias do rio Paraguai e rio Paraná, possui um pequeno corpo espesso, com três manchas escuras verticalmente alongadas, sendo a posterior, em alguns casos, difusa (Tataje e Filho, 2005). É uma espécie onívora, consumindo preferencialmente vegetais, mas podendo alimentar - se também de crustáceos e pequenos moluscos.

Além disso, é considerada uma espécie migradora, devido ao fato de realizar longos deslocamentos ascendentes durante seu período pré-reprodutivo, apresentando também desova sazonal e sem cuidado parental. (Tataje e Filho, 2005).

Espécies de peixes demonstram diferentes respostas a condições hipóxicas e hiperóxicas, fazendo deles modelos primordiais em estudos envolvendo processos dependentes de oxigênio (Lushchak e Bagnyukova, 2007).

OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi analisar as alterações oxidativas no cérebro de piauçu *Leporinus Macrocephalus* submetidos a condições de hipóxia e normóxia.

MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos foram divididos em dois grupos $n = 12$, aclimatados às condições laboratoriais por 14 dias em caixas de água de 250L, sob temperatura controlada a 23°C. Após esse período, foram então submetidos durante 96 horas a baixas concentrações de oxigênio (1 mg/L O₂) considerando a concentração 6 mg/L O₂ como controle. O ajuste da concentração de oxigênio foi feito através da adição de nitrogênio às caixas. Temperatura e níveis de oxigênio foram monitorados três vezes por dia, e a sifonagem foi diária assim como o arrazoamento, no qual foi utilizado ração comercial. No final do período experimental os peixes foram sacrificados por secção da medula espinhal e seus cérebros retirados e congelados para posteriores análises oxidativas. Os órgãos foram homogeneizados com Buffer Tris-HCl Ph 7.0 e posteriormente centrifugados a 600xg por 10 minutos. Seu sobrenadante foi retirado e congelado para realizar as análises oxidativas.

A quantificação das proteínas foi realizada através do método de Lowry *et al.*, (1951), tendo como padrão a albumina bovina. A leitura das amostras foi feita espectrofotometricamente a 625nm, e a medida de proteína será expressa em mg/mL.

As medidas de lipoperoxidação avaliam os danos causados aos lipídeos insaturados presentes nas membranas celulares (LIMA, E. e ABDALLA, D. S. P. 2001). A determinação dos níveis de peroxidação lipídica, como medida pró - oxidante, foi feita através da medida das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), pelo método de Wills (1987). A leitura das amostras foi via espectrofotômetro a 535 nm e o resultado foi expresso em nmol/mg de proteína.

A GST é uma enzima de detoxificação dos peróxidos orgânicos, utilizada como medida antioxidante. A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente a 340 nm e o resultado expresso em nmol/min/mg de proteína (Habig *et al.*, 1974).

RESULTADOS

Os resultados demonstraram uma redução significativa nos níveis de lipoperoxidação de 43,43% nos peixes submetidos a condições hipóxicas ($4,8 \pm 1,4$ nmol/mg proteína) comparados ao grupo controle ($11,05 \pm 0,79$ nmol/mg proteína), com $p < 0,05$. A atividade da enzima GST aumentou 56,57% ($175 \pm 32,7$ pmol/min/mg proteína) no grupo submetido a hipóxia em relação ao grupo controle ($99,185 \pm 9,19$ pmol/min/mg proteína), com $p < 0,05$. Ou seja, em 96 horas de hipóxia, nossos resultados indicam uma diminuição dos níveis de pró - oxidantes e um aumento dos níveis de antioxidantes.

Wilhelm Filho, D., 2007 e Wilhelm Filho *et al.*, 2005, verificaram um aumento dos níveis de Glutathione Peroxidase e Glutathione Transferase, e uma redução na peroxidação lipídica e Glutathione oxidada, especialmente no fígado de juvenis de *Leporinus elongatus* expostos a hipóxia severa ($1,92 \pm 0,09$ mg O₂ l⁻¹ h⁻¹) por 14 dias.

Em experimentos de anóxia por 8 horas realizados com *Crassius auratus*, Lushchak *et al.*, 2001), encontraram que os níveis de lipoperoxidação, através da medida dos dienos conjugados, bem como os níveis de GST, não apresentaram alterações significativas no cérebro.

Já em *Cyprinus carpio* expostos a hipóxia de 5,5 horas a 0,9 mg/mL, os níveis de lipoperoxidação por TBARS diminuíram em relação ao controle, mas foi abaixo dos níveis de significância, enquanto que a atividade da GST permaneceram inalterados (Lushchak *et al.*, 005).

O sapo leopardo *Rana pipiens*, exposto a 30 horas de anóxia indicou um aumento de 66% dos níveis de GST no cérebro, enquanto que o TBARS não apresentou modificação significativa (Hermes Lima, *et al.*, 2001).

O cérebro é comumente conhecido como um órgão chave nos processos adaptativos. (Lushchak e Bagnyukova, 2007; Hochachka e Lutz, 2001). Sendo o cérebro um tecido de fundamental importância para a sobrevivência, os peixes respondem a hipóxia protegendo primariamente seus órgãos vitais, incluindo o cérebro e o fígado (Lushchak e Bagnyukova, 2007), justificando - se assim os resultados encontrados neste experimento.

Outra possível justificativa aos nossos resultados em relação aos encontrados por outros autores em experimentos com diminuição dos níveis de oxigênio seria o longo período de exposição às condições hipóxicas.

CONCLUSÃO

Esses resultados sugerem que os peixes em condições extremas mantêm prioridades metabólicas, elevando os níveis de antioxidantes a fim de proteger os órgãos vitais, como o cérebro.

REFERÊNCIAS

- Habig WH, Pabst MJ, *et al.*, Glutathione S - transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249(22). 1974.
- Hochachka, P. W., Lutz, P. L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 130, 2001.
- Lushchak, V., Bagnyukova, T. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Percottus glenii*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 148, 2007.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., STOREY, J. M., Storey, K. B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Ciprinus Carpio*) tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 2005.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., Hermes - Lima, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280, 2001.
- Lima, E. S., Abdalla, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em respostas biológicas. *Brazilian J of Pharmaceutical Sciences*, 37(1). 2001.
- Lowry Oh, Rosebrough NJ, *et al.*, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265 - 75, 1951.
- Pavanato, M. A., Llesuy, S. F. Espécies ativas de oxigênio. In: Estresse oxidativo e inflamação. Marroni, N. P.(org). Canoas: Ed. Ulbra, 2008.
- Ribeiro, R. P., Hayashi, C. Moreira, L.M., Sussel, F. R. Sobrevivência e desempenho de pós - larvas de piavuçu, *Leporinus macrocephalus* submetidas a diferentes dietas. *Aquaculture*, 2001.
- Sampaio, F. G., Boijink, C. L., Oba, E. T., Santos, L. R. B., Kalinin, A. L., Rantin, F. T. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. e Physiol. C*, 147, 2007.
- Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 205, 1993.
- Tataje, D. R., Filho, E. Z. Cultivo do gênero *Leporinus*. In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Baldissotto, B., Gomes, L. C. (org). Santa Maria: Ed. UFSM, 2005.
- Wills, ED. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 99(3), 1966.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M. A., Zaniboni - Filho, E., Pedrosa, R. C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847).
- Wilhelm Filho, D. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Frontiers in Bioscience* 12, 2007.