



ATIVIDADE DA Na^+K^+ - ATPASE E DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO RENAL DE *PROCHILODUS LINEATUS* EXPOSTOS AO ALUMÍNIO

Bruna Lunardelli

Gabriel Troilo; Cláudia B. R. Martinez

Universidade Estadual de Londrina - Departamento de Ciências Fisiologia - Laboratório de Ecofisiologia Animal-Rod. Celso Garcia Cid, km 380. CEP: 86051 - 990, Londrina-PR E - mail: brunalunardelli@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O alumínio é o principal constituinte de um grande número de componentes atmosféricos, estando em maiores concentrações em áreas industrializadas (Casarini *et al.*, 001). Este material é muito tóxico para a maioria dos seres vivos, inclusive para a espécie humana. A Legislação Brasileira, através da resolução CONAMA 357 (2005) determina como até $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ o limite máximo de alumínio dissolvido para a água de rios e lagos destinados ao abastecimento doméstico, após tratamento simplificado, e proteção das comunidades ícticas. Os efeitos prejudiciais do alumínio têm sido bastante estudados em peixes de clima temperado. Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos dessa concentração de alumínio para a maioria das espécies de peixes nativas brasileiras (Barcarolli; Martinez, 2004).

O rim dos vertebrados terrestres é um dos órgãos responsáveis pela excreção e manutenção da homeostase dos fluidos corporais. Nos peixes, este órgão é auxiliado nesta tarefa pelas brânquias e outros tecidos como, intestino e epitélio opercular. Nos teleósteos dulcícolas o rim é responsável pela excreção de uma grande quantidade de água, que entra no corpo através das brânquias, produzindo uma urina com baixa concentração de eletrólitos. Por receber grande fluxo sanguíneo pode ser considerado órgão alvo para agentes químicos e assume posição de destaque quando se deseja avaliar efeitos citotóxicos por ser um órgão de excreção. Consequentemente, alterações bioquímicas no rim podem ocorrer em razão da introdução de agentes tóxicos na água e ser utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental.

Assim, com base na carência de informação sobre os possíveis efeitos do alumínio em espécies de peixes nativas, no presente trabalho avaliou - se a ocorrência de alterações na atividade da Na^+K^+ - ATPase e parâmetros antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) no tecido renal de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda a $0,2 \text{ mg de Al dissolvido.L}^{-1}$. A espécie *P. lineatus* (Steindachner, 1881), conhecida como curimba, foi escolhida para o presente trabalho por se tratar de uma espécie de peixe neotropical,

presente nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, sensível a diversos tipos de poluente e por isso apropriada para testes de toxicidade (Martinez *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005; Camargo; Martinez 2006).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo verificar se o alumínio promove alterações bioquímicas no tecido renal do peixe *P. lineatus* que possam vir a comprometer a osmorregulação e a capacidade antioxidante do tecido.

MATERIAL E MÉTODOS

Animal experimental e testes de toxicidade
Exemplares jovens de *P. lineatus*, fornecidos pela Estação de Piscicultura da UEL, foram aclimatados em tanques de 300L por sete dias no Laboratório de Bioensaios. Para a aclimação foi utilizada água desclorada e mantida com aeração constante. Após esse período os peixes foram submetidos a testes de toxicidade de 6h e 24h e expostos aos seguintes tratamentos: alumínio ($0,2 \text{ mg Al dissolvido.L}^{-1}$) em pH 5,0; apenas pH 5,0; e água com pH neutro (grupo controle). Foram utilizados aquários de vidro de 100L, contendo 8 peixes cada. Para o grupo controle utilizou - se apenas água desclorada. Para obter - se o pH 5,0 a água foi acidificada com ácido clorídrico. E para o meio experimental Al + pH 5,0, foi utilizado sulfato de alumínio diluído em água acidificada. O alumínio foi adicionado à água na concentração nominal de 1 mg.L^{-1} . O pH, o oxigênio dissolvido e a temperatura da água foram monitorados diariamente. Amostras de água foram coletadas após cada período experimental para a análise de Al, em espectrofotômetro de absorção atômica. A concentração de Al total foi determinada em amostras de água não - filtradas, enquanto que a concentração de Al dissolvido foi determinada em amostras filtradas ($0,45 \mu\text{m}$); para ambas as análises as amostras foram acidificadas com HNO_3 .

Amostragem

Após os peixes serem retirados da água, eles foram anestesiado com benzocaína, sacrificados por secção medular, pesados e medidos e então, com o auxílio de material de dissecação, retirou - se os rins posteriores, os quais foram armazenados em eppendorfs e transferidos para o ultra - freezer (- 80°C).

Análise dos parâmetros de estresse oxidativo

O rim foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 15.000 g por 20 minutos em centrífuga refrigerada (4°C). O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathione S transferase (GST), da concentração de glutathione reduzida (GSH) e da ocorrência de lipoperoxidação (ensaio T - BARS).

A atividade da CAT foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo - se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio através do decréscimo de absorbância a 240 nm. A atividade da GST foi determinada seguindo - se a complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1 - cloro - 2,4 - dinitrobenzeno (CDNB), em espectrofotômetro, no comprimento de onda 340 nm, de acordo com a metodologia descrita por Keen *et al.*, (1976). A concentração de GSH foi estimada pela reação da glutathione reduzida com o DTNB, formando o tiolato (TNB) que tem cor amarelada. Quanto maior a presença de GSH, mais acentuada a cor, que foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 412nm. O lipoperóxido foi medido colorimetricamente pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) de acordo com a metodologia descrita por Satoh (1978). Foi utilizado o padrão de malonaldeído (MDA) de 20 mM e a leitura de absorbância em espectrofluorímetro a 530 nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951), em espectrofotômetro a 700 nm, utilizou - se como padrão protéico albumina de soro bovino. Os resultados foram expressos por mg de proteínas.

Análise da atividade da Na⁺/K⁺ - ATPase

Alguns rins foram separados e congelados (- 80°C) em tampão SEI (Sacarose - EDTA - Imidazol, pH 7,4). O tecido foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 10.000 g (4°C). O sobrenadante, foi utilizado para a determinação de proteína total (Lowry *et al.*, 1951) e da atividade da Na⁺K⁺ - ATPase pelo método adaptado para leitura de micropalaca por Nolan (2000). A leitura foi feita em 620 nm e a atividade da enzima foi expressa em M Pi/mg proteínas/h.

Análises estatísticas

Os grupos pH e Al de 6 horas e 24 horas foram comparados com seus respectivos controles e entre si por meio de análise de variância (ANOVA). Foram considerados significativos valores de P < 0,05.

RESULTADOS

As amostras de rim dos peixes expostos ao pH por 24 horas não foram suficientes para as análises das defesas antioxidantes. Os resultados (média ± desvio padrão) mostraram que os peixes do grupo Al e do grupo pH, após 6h, apresentaram atividade renal da enzima CAT (1,25 ± 0,53 e 2,79 ± 1,06, respectivamente) significativamente maior que o grupo controle (0,95 ± 0,40). Ao passo que a atividade

renal da CAT dos animais expostos por 24h ao Al (1,48 ± 0,69) não variou significativamente em relação ao controle (1,62 ± 0,92).

O aumento da atividade específica da CAT tem sido relatado como indicador de estresse oxidativo, o qual é resultado da tentativa da célula em eliminar espécies reativas de oxigênio, formadas na metabolização de diversos compostos químicos. A indução da catalase sugere uma defesa do organismo frente a agentes oxidantes, pois é uma enzima essencial para a remover peróxido de hidrogênio e evitar a formação de radicais hidroxil que podem causar danos celulares (Van der Oost *et al.*, 2003; Atli *et al.*, 2006).

Por outro lado, no tempo experimental de 6h houve uma diminuição significativa da atividade renal da enzima glutathione S transferase (GST) nos grupos Al e pH (7,75 ± 2,80 e 7,93 ± 0,45, respectivamente) em relação ao controle (15,40 ± 4,60). Já no tempo experimental de 24h a atividade da GST no grupo Al (45,0 ± 13,87) não variou de forma significativa em relação ao controle (57,05 ± 11,98).

A GST desempenha importante papel no processo de detoxificação, uma vez que pode metabolizar grande variedade de composto xenobióticos orgânicos, por meio da conjugação destes com a glutathione reduzida (GSH), formando substâncias de baixa toxicidade. No presente trabalho a GST teve sua atividade diminuída, indica que após 6h de exposição ao Al a maior parte da GSH estava sendo oxidada e, portanto estava indisponível para atuar na conjugação catalisada pela GST.

Esta idéia se sustenta no fato que os animais expostos ao Al por 6h apresentaram diminuição significativa na concentração de GSH no rim (2,01 ± 1,26) em relação aos peixes do grupo controle (5,35 ± 1,49). Já os animais exposto por 24h ao Al não apresentaram variação significativa da concentração da GSH em relação ao controle.

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo - a contra lesões resultantes da exposição a agentes oxidantes. Além disto, participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação e é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas. No presente trabalho houve a diminuição na concentração da GSH, o que representa um decréscimo das defesas antioxidantes do animal. Em ratos expostos ao alumínio também foi encontrado diminuição da concentração de GSH em seus rins (Mahieu *et al.*, 2005).

A concentração de lipoperóxidos no rim de *P. lineatus* expostos ao alumínio por 24h, estimada pelo ensaio TBARS, apresentou uma tendência de aumento em relação ao controle (0,32 ± 0,28; 0,08 ± 0,01, respectivamente), entretanto essa diferença não foi significativa em virtude da grande variação dos resultados. O aumento da concentração de lipoperóxidos (ensaio TBARS) nos rins dos peixes expostos ao alumínio por 24h indica que as defesas antioxidantes não são suficientes para evitar a ocorrência de lesões oxidativas, resultando no estresse oxidativo.

A atividade renal da enzima Na⁺K⁺ - ATPase (média ± erro) nos peixes do grupo Al e do grupo pH (0,25 ± 0,07 e 0,20 ± 0,04, respectivamente) aumentou significativamente no tempo experimental de 6h em relação ao controle (0,17

$\pm 0,15$). Entretanto, no tempo experimental de 24h a atividade da enzima apresentou uma tendência à diminuir no rins dos peixes do grupo Al e do grupo pH ($0,47 \pm 0,23$ e $0,59 \pm 0,14$, respectivamente) em relação ao controle ($1,03 \pm 0,40$).

A enzima Na^+K^+ - ATPase no rim dos teleósteos de água doce está primariamente envolvida na reabsorção de íons monovalentes para a produção de enzima diluída (Evans, 1993). No presente trabalho tanto o pH ácido, como o alumínio, promoveram um decréscimo na atividade desta enzima, após 24h de exposição. Embora não significativo, esta redução da atividade da enzima pode ver a prejudicar a manutenção da homeostase osmótica de *P. lineatus* em períodos de exposição mais longos.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que a exposição aguda ao alumínio, na concentração limite determinada na legislação Brasileira, promove alterações bioquímicas que podem causar estresse oxidativo e prejudicar a manutenção da homeostase osmótica em *Prochilodus lineatus*.

Agradecimentos.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do CT - Hidro (CNPQ). Os autores agradecem as bolsas de iniciação científica para B. Lunerelli (Fundação Araucária) e G. Troilo (PIBIC/CNPq) e a bolsa de pesquisador para C.B.R.Martinez (CNPq).

REFERÊNCIAS

Almeida, J.S.; Meletti, P.C.; Martinez, C.B.R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)**, 140: 356 - 363. 2005.

Atli, G.; Alptekin, Ö.; Tükel, S.; Canli, M. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 143: 218-224. 2006.

Bagnyukova, T.V., Chaharak, O.I., Lushchak V.I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, 78: 325 - 331. 2006.

Barcarolli, I.F., Martinez, C.B.R. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters

of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 72, 639 - 646. 2004.

Beutler, E. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton. 1975.

Camargo, M.P.; Martinez, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 21: 61 - 69. 2006.

Casarini, D.C.P., Dias, C.L., Alonso, C.D. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. **Série Relatórios Ambientais**. Cetesb, São Paulo, 245 p. 2001.

CONAMA 2005 Conselho Nacional do Meio Ambiente do Ministério do Meio Ambiente. Resolução número 357 de 17 de março de 2005. In: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=38>

Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E. Na^+K^+ - ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. **The Journal of Experimental Biology**, 203: 379 - 387. 2000.

Evans, D. H. **The Physiology of Fishes**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione - S - transferase. **Journal of Biological Chemistry**, 20:6183 - 6188. 1976.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193: 265 - 276. 1951.

Mahieu, S., Mille, N., Gonzales, M., Contini, M.C., Elías, M.M. Alterations of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminium during the initial phase of hepatic regeneration. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 99: 1858 - 1864. 2005.

Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal Biology**, 64: 797 - 807. 2004.

Nolan, D.T. Skin response of fish to stressors. Tese de Doutorado-Universidade Católica de Nijmegen, Holanda. 2000.

Satoh, K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. **Clinical Chimica Acta**, 90:37 - 43. 1978.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13: 57 - 149. 2003.