



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Danielly Pereira Garcia

**Metabolismo do Malondialdeído em peixes: Implicações na
avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de
contaminação aquática**

São José do Rio Preto- SP

2016

Danielly Pereira Garcia

Metabolismo do Malondialdeído em peixes: Implicações na avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de contaminação aquática

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto- SP

2016

Garcia, Danielly Pereira.

Metabolismo do malondialdeído em peixes : implicações na avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de contaminação aquática / Danielly Pereira Garcia. -- São José do Rio Preto, 2016
93 f. : il., tabs.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química da água. 2. Toxicologia ambiental. 3. Malondialdeído.
4. Lambari (Peixe) - Efeito da poluição da água. 5. Peroxidação de lipídeos.
6. Marcadores biológicos. 7. Stress oxidativo. I. Almeida, Eduardo Alves de.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Danielly Pereira Garcia

Metabolismo do Malondialdeído em peixes: Implicações na avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de contaminação aquática

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

UNESP – São José do Rio Preto – SP

Orientador

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

UNESP – São José do Rio Preto – SP

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira

UNIFESP - Baixada Santista - SP

São José do Rio Preto – SP

29 de março de 2016

*“Dedico este trabalho aos meus pais, Miguel e Silvania e
aos meus irmãos Bruna e Neto”*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos para:

Aos meus pais Miguel e Sylvania que sempre apoiaram nos meus sonhos e me deram subsídio para que eu pudesse prosseguir.

Ao Professor Dr. Eduardo Alves de Almeida por ser o melhor orientador que eu poderia ter. Obrigada por estar disponível para me auxiliar sempre que precisei, por me ajudar com suas ideias e sabedoria.

Ao doutor Danilo Grünig Humberto da Silva, não tenho palavras para expressar minha gratidão por este companheiro de laboratório. Obrigada pelas ideias, inúmeras ajudas e por sanar minhas dúvidas mesmo nos finais de semana e feriados.

Á Isabela (isa) meus dias de trabalho no laboratório não seriam o mesmo sem esta amiga.

Á doutoranda Daína Lima pela monitoria online durante todo projeto.

Aos colegas de laboratório que tornaram o ambiente de trabalho muito mais divertido. Foi um prazer passarmos este tempo juntos!

Ao professor Dr. Luis Octavio Regasini e ao Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva, pela valiosa contribuição durante o exame de qualificação.

A CAPES pela bolsa concedida.

Á Deus pelo presente que é viver.

RESUMO

Dentre os efeitos negativos da exposição a poluentes nos animais aquáticos podemos destacar o estresse oxidativo, uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio, conseqüentemente, uma cascata de eventos bioquímicos denominados peroxidação lipídica (PL) ocorrem tendo como principal produto o malondialdeído (MDA). Assim, ainda que o aumento dos níveis de MDA esteja relacionado a intoxicação por poluentes, alguns trabalhos têm mostrado uma diminuição do MDA frente a essa exposição, mesmo com alterações em enzimas antioxidantes. Deste modo, este trabalho teve por objetivo avaliar se possíveis decréscimos nos níveis de MDA em peixes *Astyanax altiparanae* expostos a contaminantes ambientais pode ter relação com aumentos na atividade de defesas antioxidantes, aumentos na atividade da ALDH ou excreção do MDA na água. Assim, os lambaris foram expostos a misturas de metais (cádmio e cobre) nas concentrações 40 e 100 µg/L e a biodiesel B5 nas concentrações de 0,001, 0,01 e 0,1 mL/L para verificar a relação entre MDA e as enzimas antioxidantes, em amostras de brânquia e fígado. Um segundo experimento, injetando MDA nos espécimes foi realizado, nestes organismos, foram injetados intraperitonealmente doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg de MDA com coleta do material biológico após 5 dias para avaliar o efeito do MDA no fígado e na brânquia do lambari. Um terceiro experimento foi realizado para avaliar a metabolização do MDA em brânquia e fígado e sangue com coleta de material biológico e água nos tempos zero (logo após receber a dose), 1 e 12 horas. Nestes experimentos a metabolização do MDA foi observada pela atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e as enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glicose – 6- fosfato-desidrogenase (G6PDH) e a de biotransformação glutathiona S-transferase (GST), peróxidos lipídicos (FOX), níveis de glutathiona total (GSH-t) e ensaio do MDA. Por fim foi realizado um experimento in vitro para avaliar o efeito do MDA nas enzimas (CAT, GPx, G6PDH, GST e ALDH). Nossos resultados mostraram que o MDA tem vias de metabolização e que o aumento das enzimas antioxidantes não é responsável por sua diminuição. Sugerimos que o B5 foi capaz de induzir a atividade da ALDH e esta diminuiu a quantidade de MDA nos dois grupos de maior concentração de B5. O MDA

não foi capaz de induzir a atividade da ALDH, entretanto observamos uma forte correlação entre o MDA e a ALDH. O experimento *in vitro* mostrou que em concentrações elevadas o MDA pode até mesmo inibir a atividade da ALDH, sugerindo que esta enzima atue na manutenção dos níveis basais deste aldeído. Por fim, o trabalho mostrou que o lambari foi capaz de eliminar o MDA em excesso por meio da excreção, fortalecendo nossa hipótese de que o organismo dos peixes utiliza vias de excreção e da ALDH para eliminar o excesso deste aldeído tóxico produzido na PL por estressores ambientais.

Palavras-chave: Malondialdeído, Aldeído desidrogenase, Estresse oxidativo, *Astyanax* sp.

ABSTRACT

Among the adverse effects of exposure to pollutants in aquatic animals, we can highlight oxidative stress, which can be caused due to an exacerbated production of reactive oxygen species along with a cascade of biochemical events. During this cascade, one of oxidative consequences we can observe is called lipid peroxidation (LPO) with its main product malondialdehyde (MDA). Thus, although the increase in MDA levels is related to intoxication by pollutants, some studies have shown a decrease in MDA levels in aquatic organisms exposed to pollutants, even with significant improvement in antioxidant enzymes. Thus, this study aimed to assess the relationship among the reduced MDA levels in *Astyanax altiparanae* fish exposed to environmental contaminants, and increased antioxidant defenses and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity, or excretion of MDA in the water. In this way, the fishes were exposed to mixtures of metals (cadmium or copper) at concentrations of 40 g/L and 100 g/L and B5 biodiesel in concentrations of 0.001 mL/L, 0.01 mL/L and 0.1 mL/L in order to verify the relation between MDA and antioxidant enzymes in the liver, and gill samples. We performed a second experiment by injecting MDA in the fish specimens. We intraperitoneally injected doses of 10 mg/kg and 100 mg/kg of MDA. After 5 days, we collected the liver and gill in order to evaluate the effect of MDA in the fishes. A third experiment was conducted to investigate MDA metabolization in blood, gill and liver samples, through collection of biological material and water at zero time (shortly after receiving the same intraperitoneal injections as in the second experiment), 1 and 12 hours after the injections. In these experiments, the MDA metabolization was monitored by the activity of ALDH and by the antioxidant enzymes such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutathione-S-transferase biotransformation (GST), lipid peroxides by ferrous ion oxidation xylenol orange (FOX) assay, the total glutathione (GSH-t) and MDA assay. Finally, an experiment was conducted in vitro to evaluate the effect of enzymes on MDA (CAT, GPx, G6PDH, GST and ALDH). Our results showed that the MDA levels have metabolizing pathways and increased antioxidant enzymes are not responsible for their decrease. We suggest that the B5 was able to induce the ALDH activity, Moreover, ALDH was related to reduced amount of MDA in both groups of higher B5 concentration. The MDA was not able to induce the activity of ALDH, despite we found a strong correlation between the MDA levels and ALDH activity. In the in vitro experiment, we observed that high concentrations of MDA could even inhibit the activity of ALDH, suggesting that this enzyme acts in the maintenance of basal levels of this aldehyde. Finally, the study showed that the *Astyanax altiparanae* have been able to eliminate the MDA excess by excretion. This fact reinforces our hypothesis that the fish uses excretion routes and ALDH to eliminate excess of this toxic aldehyde produced during LPO caused by stressors environmental.

Keywords: Malondialdehyde, Aldehyde dehydrogenase, Oxidative stress, *Astyanax* sp.

LISTA DE FIGURAS

1. Esquema simplificado das fases do metabolismo de detoxificação.....	17
2. Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB	19
3. Esquema da peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados e seus principais subprodutos (LIMA; ABDALLA, 2001 com modificações).....	21
4. Estrutura química do malondialdeído (MDA).....	23
5. Reação do malondialdeído com lisina formando N-2-propenais (Adaptado de GIRÓN-CALLE et al., 2002).....	24
6. Formação de aduto fluorescente da reação entre malondialdeído (MDA) e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) via catalise ácida com mecanismo de adição nucleofílica.	26
7. Esquema da metabolização do MDA por isoformas da ALDH (Adaptado de Marchitti e colaboradores (2008).....	29
8. Organismo modelo: <i>Astyanax altiparanae</i>	35
9. Tanque de aclimação	36
10. Esquema do experimento de indução do estresse oxidativo por poluente modelo em <i>Astyanax altiparanae</i>	38
11. Esquema de montagem de experimento de 5 dias com injeção intraperitoneal de MDA com dose de 10 e 100 mg/kg em <i>Astyanax altiparanae</i> para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes	39
12. Disposição dos aquários no experimento de 5 dias com injeção intraperitoneal de 10 e 100 mg/kg de MDA em poluente modelo em <i>Astyanax altiparanae</i> , para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes	40
13. Sequência de procedimentos para injeção intraperitoneal de MDA com dose de 10 mg/kg em <i>Astyanax altiparanae</i> para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes no experimento de 12 horas	42
14. Esquema de montagem de experimento de 12 horas com injeção intraperitoneal de MDA com dose de 10 mg/kg em <i>Astyanax altiparanae</i> para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes	43

15. Disposição dos aquários no experimento de 12 horas com injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de MDA em poluente modelo em *Astyanax altiparanae*, para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes..... 43
16. Atividade da Catalase em amostras de fígado de lambari *Astyanax altiparanae* em diferentes tratamentos.....54
17. Atividade enzimática das enzimas GPx, G6PDH, GST e CAT em amostras de brânquia de *Astyanax altiparanae*, expostos à mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40 µg/L (M40) e 100 µg/L(M100) e B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1) após 5 dias de exposição.....56
18. Parâmetros bioquímicos relacionados a níveis de GSH total, e níveis de peroxidação lipídica avaliados pela quantidade de peróxidos lipídicos (FOX) e MDA em amostras de brânquia e água de *Astyanax altiparanae*, expostos a mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40 µg/L (M40) e 100 µg/L(M100) e B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1).....58
19. Parâmetros bioquímicos relacionados a atividades da GPx, CAT, G6PDH e GST, níveis de GSH total, e níveis de peroxidação lipídica avaliados pela quantidade de peróxidos lipídicos (FOX) em amostras de fígado de *Astyanax altiparanae*, expostos a mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40 µg/L (M40) e 100 µg/L(M100) e B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1).....5
20. Gráfico mostrando quantidade de MDA e atividade da ALDH em amostras de fígado de *Astyanax altiparanae*, expostos a mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40 µg/L (M40) e 100 µg/L(M100) e B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1).....60
21. Correlação de Spearman entre MDA e ALDH em para amostras de fígado de *Astyanax altiparanae* após 5 dias de exposição a B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1).....61
22. Gráfico dos níveis de peróxidos lipídicos (FOX) e quantidade de MDA e níveis de GSH total : Gráfico da quantidade de GSH- total em amostras de brânquia e

fígado de lambari <i>Astyanax altipanae</i> injetados com solução salina (controle) e solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado) após 5 dias de exposição.....	64
23. Gráficos das atividades de enzimáticas da GST, CAT, GPx e G6PDH em amostras de brânquia e fígado de lambari <i>Astyanax altipanae</i> injetados com solução salina (controle) e solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado) após 5 dias de exposição.....	66
24. Gráfico da atividade da ALDH em amostras de fígado de lambari <i>Astyanax altipanae</i>	68
25. Gráfico da quantidade de MDA em amostras de fígado e sangue, níveis de GSH total e atividade da ALDH em fígado em amostras de lambari <i>Astyanax altipanae</i> injetados com solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado), experimento com coleta de grupo no tempo zero, uma hora e 12 horas após a exposição.....	70
26. Gráfico referente a MDA em água nos tempos de zero, 1, 12 e 24 horas em peixes <i>Astyanax altiparanae</i> que receberam dose de 10 mg/Kg de MDA.....	71
27. Gráfico da atividade da GST, GPx e G6PDH e quantidade de peróxidos lipídicos (FOX) em amostras de fígado de lambari <i>Astyanax altipanae</i> injetados com solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado), experimento com coleta de grupo no tempo zero, uma hora e 12 horas após a exposição.....	72
28. Tabela das atividades enzimáticas da GST, GPx, G6PDH e CAT em amostras de fígado e brânquia de <i>Astyanax altipanae</i> no experimento in vitro, incubados com MDA.....	74
29. Gráfico da atividade da GST, GPx, CAT e G6PDH, quantidade de peróxidos lipídicos (FOX) e MDA em amostras de brânquia de lambari <i>Astyanax altipanae</i> injetados com solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado), experimento com coleta de grupo no tempo zero, uma hora e 12 horas após a exposição.....	75

LISTA DE TABELA

1. Parâmetros físicos-químicos no experimento de teste de concentração em *Astyanax altiparanae*. 39
2. Parâmetros físicos-químicos no experimento de indução ao estresse oxidativo por poluente modelo em *Astyanax altiparanae*... 41
3. Tabela com valores em pmol/mg de tecido em brânquia e fígado de MDA livre em lambari *Astyanax Altiparanae*. injetados com solução salina (controle) e solução de MDA 10mg/kg 43

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. Contaminação Aquática	15
1.2. MDA como indicativo de lesão.....	22
1.3. Metabolismo do MDA.....	27
2. Objetivos	32
3. Material e Métodos	34
3.1. Lambari.....	34
3.2. Indução do estresse por poluentes modelo.....	36
3.3. Avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes.....	38
3.3.1. Experimento de 5 dias.....	38
3.3.2. Experimento de 12 horas.....	40
3.4. Experimento <i>in vitro</i>	44
3.5. Análises bioquímicas.....	45
3.5.1. Quantificação de MDA.....	45
3.5.2. Glutathione total (GSH-t).....	45
3.5.3. Hidroperóxidos Lipídicos (FOX).....	46
3.5.4. Atividade da aldeído desidrogenase (ALDH).....	47
3.5.5. Preparo das amostras para análises das enzimas GST, GPx, G6PDH e CAT.....	48
3.5.5.1. Análise de proteína.....	48
3.5.5.2. Ensaio da Catalase (CAT).....	48
3.5.5.3. Ensaio da Glutathione S-transferase (GST).....	48
3.5.5.4. Ensaio da Glutathione peroxidase (GPx).....	48
3.5.5.5. Ensaio da Glicose – 6- fosfato- desidrogenase (G6PDH).....	49
3.6. Análise estatística.....	49
4. Resultados e Discussão	51
5. Conclusões	78
Referências	80
Anexo I- Comissão de ética do uso de animais	87
Anexo II – Lista de Sigla e Abreviações	88

Introdução

1. Introdução

1.1. Contaminação Aquática

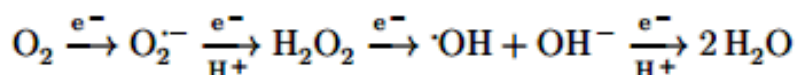
O ambiente aquático é quase sempre receptor final dos poluentes gerados pelo ser humano, seja através das precipitações, escoamentos superficiais, ou descargas diretas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Uma vez no ambiente aquático, esses poluentes podem ser captados pelos animais aquáticos e exercerem efeitos negativos em sua fisiologia, muitas vezes prejudicando seu ciclo de vida e sobrevivência (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI; FIOTAKIS, 2009). Desta forma, estudos de diagnósticos da contaminação ambiental são relevantes para avaliar o impacto provocado por contaminantes, assim como, implementar medidas preventivas.

Para diagnosticar a contaminação ambiental existem várias abordagens, entre elas, a análise química do contaminante nas diferentes matrizes ambientais, que são importantes para trazer informações a estudos ambientais ou ao monitoramento da espécie química em um determinado local (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2004). Entretanto, de maneira isolada, dados quantitativos de concentração dos poluentes nos ecossistemas nem sempre refletem sua ação no organismo. Assim avaliar a quantidade de poluente não é suficiente, havendo necessidade de detectar o efeito destes poluentes nos organismos que sofreram tal exposição (ANTONIO; MICHELUTTI; MENDONÇA, 2015).

Os biomarcadores de poluição são ferramentas que indicam as primeiras mudanças fisiológicas do organismo em decorrência à exposição a contaminantes ambientais (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN; 2003), sendo definidos como qualquer resposta biológica frente a um poluente ambiental que indiquem uma situação

de exposição ao mesmo (GESTEL; BRUMMELEN, 1996). Alterações em diversos sistemas bioquímicos têm sido usadas como biomarcadores de poluição em animais aquáticos, tais como a inibição da acetilcolinesterase por inseticidas organofosforados e carbamatos (WANG et al., 2015), alteração de enzimas de biotransformação em resposta a contaminantes orgânicos diversos (ARUKWE et al., 2015), indução de metalotioneínas (MEENA et al., 2015), inibição da porfobilinogênio-sintase (LOMBARD; PERI; GUERRERO., 2010), indução de vitelogenina em resposta a compostos estrogênicos (ARMSTRONG et al., 2015), alterações no material genético em decorrência da exposição a compostos genotóxicos (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2015) e alterações em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo (NOGUEIRA et al., 2015).

Dentre os inúmeros efeitos negativos dos poluentes nos animais aquáticos está o estresse oxidativo, ou seja, uma situação onde geralmente ocorre uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) além da capacidade antioxidante do organismo, levando a aumentos significativos nos níveis de lesões oxidativas às biomoléculas (NISHIDA, 2011), muitas vezes ocasionando na perda de funções celulares. As ERO são representadas por radicais livres, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}) e radical peroxila (ROO^{\cdot}), mas também por espécies reativas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podendo ser produzidas fisiologicamente (Equação 1) (BARREIROS et al., 2006).

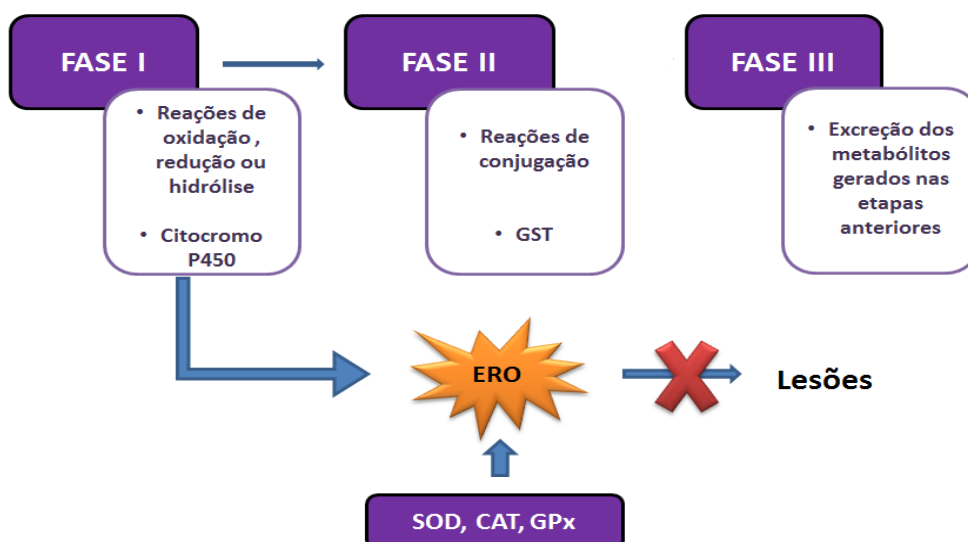


Eq 1.

Assim, o aumento da ERO pode estar relacionada com a respiração mitocondrial visto que diferentes componentes da cadeia podem produzir ERO, tais como, NADH desidrogenase, coenzima Q e desidrogenases matriciais (KOWALTOWSKI, 2004). A biotransformação de xenobióticos ocorre a produção de ERO, durante a exposição à radiação ionizante e à exposição a poluentes ambientais, como agrotóxicos, metais, compostos.

As reações de biotransformação de um composto químico, podem ser utilizadas como biomarcador de contaminação ambiental, elas tem por objetivo deixar o contaminante mais solúvel em água (hidrofílico) para que possa ser excretado com mais facilidade. O metabolismo de biotransformação do xenobiótico pode ser dividido em três fases como mostra o esquema a seguir (Figura 1):

Figura 1: Esquema simplificado das fases do metabolismo de detoxificação.



Nota: Quando as reações não estão bem acopladas, pode-se gerar ERO. Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) presentes nas células impedem que as ERO provoquem lesões em macromoléculas.

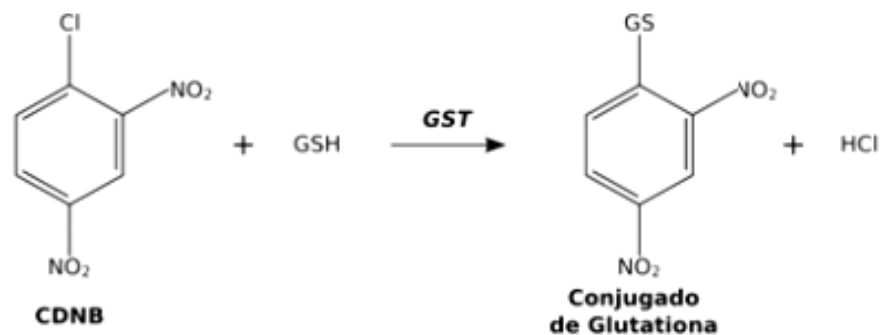
A fase I envolve a exposição ou adição de grupos funcionais reativos através de reações de oxidação, redução e hidrólise. Esta etapa tem por objetivo deixar o composto mais hidrossolúvel, facilitando assim a excreção destes metabolitos. Esta etapa pode ser catalisada por enzimas microssomais monooxigenases, representadas primordialmente pela superfamília do citocromo P450. O citocromo P450 é um complexo multienzimático localizado nos retículos endoplasmáticos lisos principalmente do fígado (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As reações de fase II também são chamadas de reações de conjugação, tais como, glicuronidação, sulfonação, acetilação, metilação, conjugação com glutatona (GSH) e conjugação com amino ácidos, a maioria das reações formam compostos altamente polarizáveis e hidrossolúveis.

Dentre os compostos endógenos a GSH possui papel de destaque. Um conjunto de enzimas denominadas glutatona S-transferase, conjugam a GSH em vários compostos eletrofílicos. Para determinação da atividade das GST total normalmente se utiliza o substrato artificial o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), por ser substrato de todas as isoformas da GSTs (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) (Figura 2). Além de atuarem na fase II da biotransformação, as GSTs podem atuar também como enzimas antioxidantes, por exemplo, pois já foi verificada que a isoforma alfa possui também atividade peroxidase (PRABHU et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005). Estudos ambientais avaliaram a atividade da GST como biomarcador, visto que diversos compostos tóxicos são capazes de induzir sua atividade, assim como em peixes tilápia-do-nilo da espécie *Oreochromis niloticus* expostos ao biodiesel (NOGUEIRA et al., 2011) e truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* injetados com pesticida paraquato

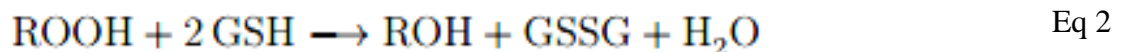
(SETEPHENSEN, STURVE, FÖRLIN, 2002) que tiveram a atividade da GST induzida.

Figura 2: Reação de substituição catalisada pela GST no substrato CDNB.



Nota: A GSH é introduzida na posição 1 no lugar do Cl dando origem a um conjugado de glutathiona.

Dentre as enzimas de fase II, as peroxidases são enzimas antioxidantes que catalisam a redução de peróxidos lipídicos e de hidrogênio a seus álcoois correspondentes. Todas as isoformas utilizam a glutathiona como doadora de elétrons (NORDBERG; ARNER, 2001). Localizada no citosol e na matriz mitocondrial divide com a catalase a habilidade de detoxificar H₂O₂ (Equação 2). Estas enzimas possuem papel importante dentro do sistema de defesa antioxidante, visto que previnem a peroxidação lipídica (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).



Outras enzimas antioxidantes, as CATs são heme-enzimas encontradas principalmente nos hepatócitos eritrócitos, estando em grandes concentrações nos

peroxissomos e em baixas nas mitocôndrias promovendo a redução do H₂O₂ em H₂O mais O₂ (Equação 3) (ZHANG et al., 2004, NETO et al., 2008).



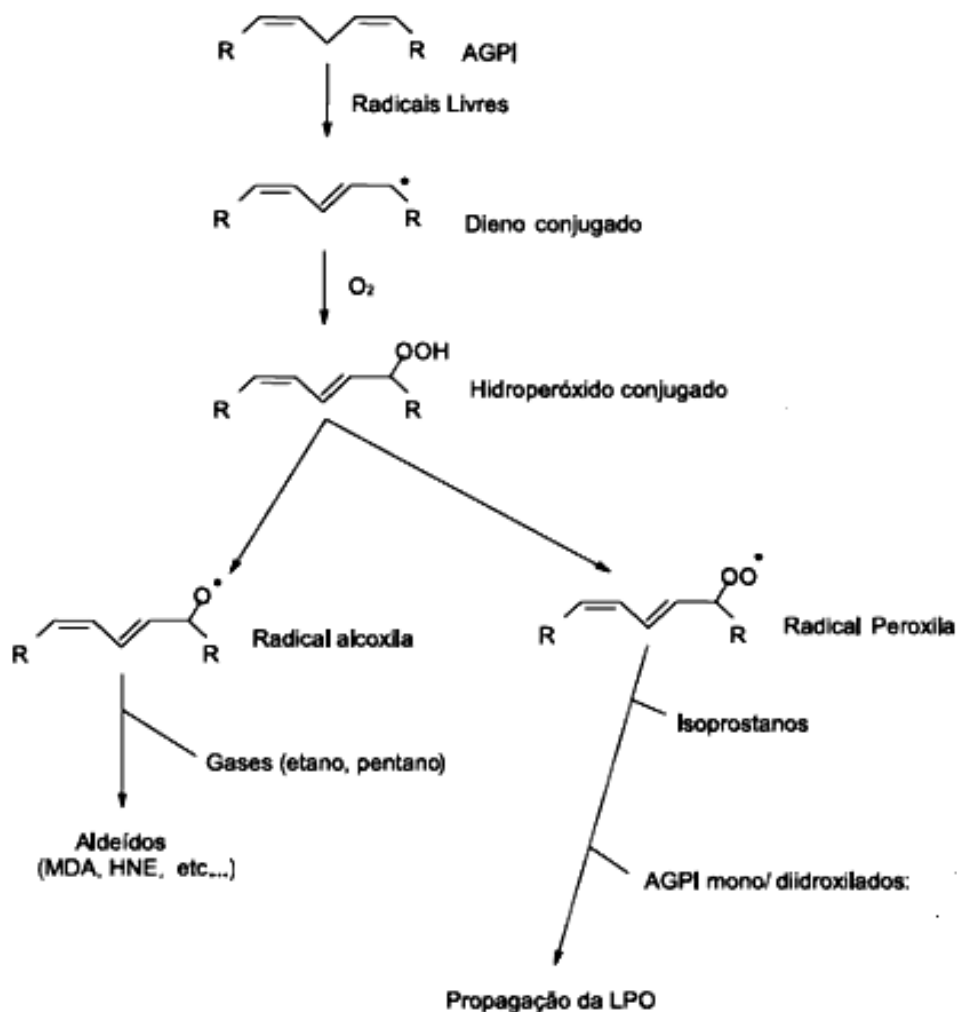
A enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase pode ser considerada como uma enzima antioxidante coadjuvante no ciclo das pentoses, a G6PDH produz NADPH durante a oxidação de glicose-6 fosfato no ciclo das pentoses. Quando o fornecimento de NADPH encontra-se prejudicado a função antioxidante da glutathiona é afetada, pois a GSH não pode ser regenerada, o que causa sérios danos ao metabolismo (SLEKAR; KOSMAN; CULOTTA, 1996).

As vias de metabolização de muitos compostos químicos geram ERO, como as reações de Fase I da biotransformação, ainda que haja um sistema de defesa antioxidante, ele pode não ser capaz de combater todas essas espécies reativas geradas pelos contaminantes ou no metabolismo, provocando o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio podem provar danos nas membranas lipídicas e este processo é conhecido como peroxidação lipídica (PL).

A PL (Figura 3) é a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, podendo ocorrer em consequência do estresse oxidativo ou ainda como um mecanismo fisiológico de formação de mensageiros celulares, tais como, as reações que produzem ERO em sua via metabólica na formação da prostoglandinas e tromboxanos (RIBEIRO; 2006). Diversos marcadores de PL têm sido avaliados em modelos animais sendo indicativo de estresse oxidativo decorrentes da intoxicação por poluentes, tais como a quantificação de hidroperóxidos lipídicos (ensaio da FOX) (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991) e a quantificação de seus subprodutos, assim como o

malondialdeído (MDA). Este, geralmente é o aldeído gerado em maior abundância como subproduto da PL (DRAPER; MCGIRR; HADLEY, 1986).

Figura 3: Esquema da peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados e seus principais subprodutos (LIMA; ABDALLA, 2001 com modificações).

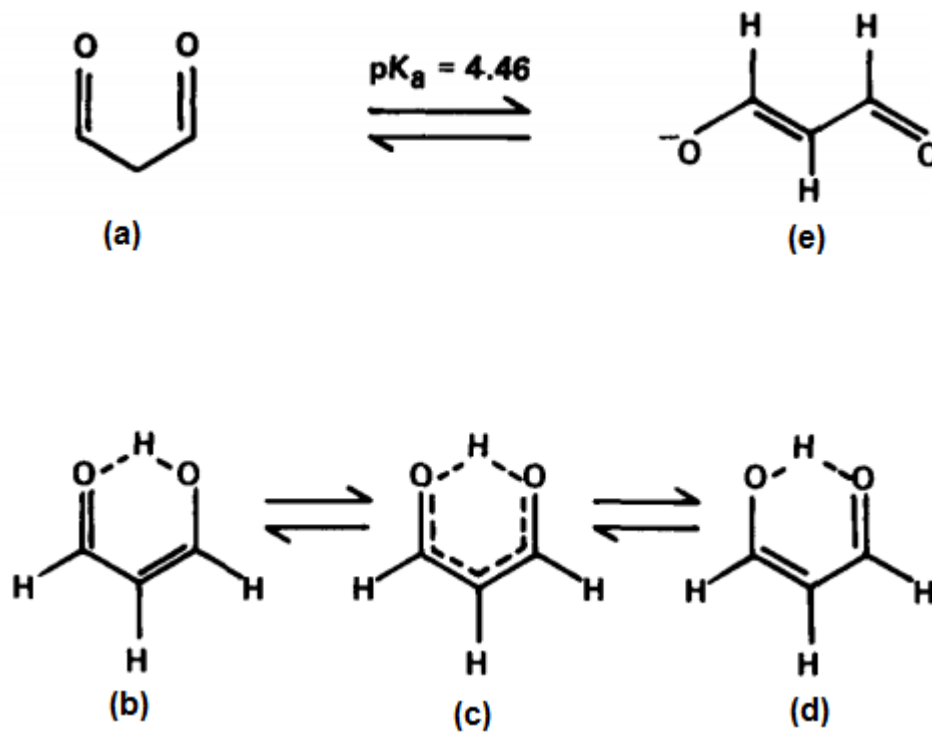


Nota: A peroxidação lipídica é uma cascata de eventos resultantes da ação das ERO sobre membranas lipídicas, compostas de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), levando a destruição de sua estrutura. Inicialmente a membrana sofre ação de um radical livre (um oxigênio na sua forma ativada) que abstrai um átomo de hidrogênio formando um radical carbono que sofre rearranjo, formando um dieno conjugado (ligações duplas intercaladas por ligações simples), este, em meio aeróbico incorpora um oxigênio molecular formando um radical peróxila que podem abstrair um hidrogênio formando um hidroperóxido lipídico (primeiro produto da peroxidação lipídica). Os radicais peróxila também podem sofrer clivagem ou dismutação formando aldeídos (dentre eles o MDA).

1.2. MDA como indicativo de lesão

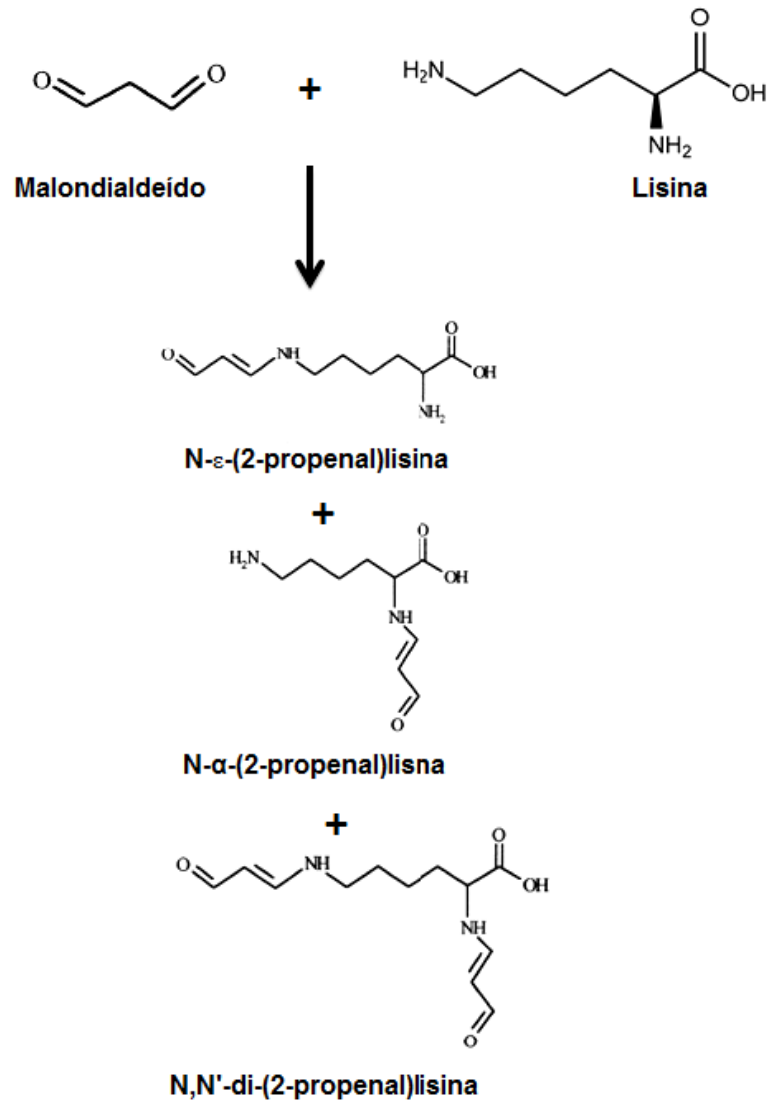
O MDA é um dialdeído (Figura 4) volátil, com baixo peso molecular ($C_3 H_4 O_2$, P.M. = 72,07), cadeia curta 1,3- dicarbonil e um ácido moderadamente fraco ($pK_a = 4,46$) (LIMA; ABDALLA, 2001). O MDA é amplamente utilizado na ciência dos produtos alimentícios, uma vez que é usado para medir índice de peroxidação lipídica em alimentos e produtos alimentares. Seu surgimento predominante ocorre durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados com três ou mais duplas ligações, podendo ser formado não enzimaticamente como produto da peroxidação lipídica e enzimaticamente como produto da reação da ciclooxigenases no metabolismo das prostaglandinas (DRAPER; MCGIRR; HADLEY, 1986).

Figura 4: Estrutura química do malondialdeído (MDA).



Em pH neutro o MDA está presente como um ânion enolato com baixa reatividade química, entretanto quando o pH diminui a reatividade deste composto aumenta, fazendo com que ele seja capaz de interagir com resíduo de aminoácidos, tais como, lisina, histidina e arginina, formando vários adutos, tais como a *N*-propenal-lisina (Figura 5) (RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

Figura 5: Reação do malondialdeído com lisina formando N-2-propenais (Adaptado de GIRÓN-CALLE et al., 2002)



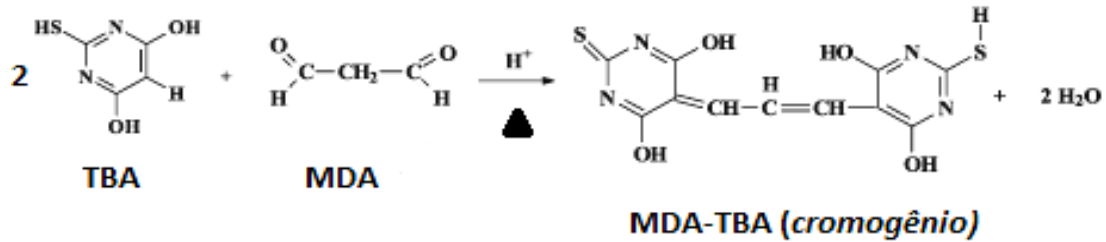
Mesmo sendo biomarcador de estresse oxidativo clássico, o MDA produzido na PL pode não estar em sua forma livre, devido a possíveis ligações covalentemente com diversas moléculas, tais como, nas reações com grupos alfa amino de amino ácidos formando os adutos ou ainda ser excretado (DRAPER; MCGIRR; HADLEY, 1986). Estas rotas metabólicas podem promover um falso negativo na avaliação do estresse oxidativo, pois esse excedente de MDA ligado pode não ser adequadamente detectado

em amostras biológicas dependendo do método de avaliação deste dialdeído (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990).

Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), o MDA reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (DRAPER; HADLEY, 1990; JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

A análise de MDA normalmente é realizada por meio da reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), esta reação ocorre em pH ácido e em alta temperatura gerando um produto cromógeno róseo (completo MDA-TBA), extraído com butanol possui alta absorvidade molar que pode ser quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no espectro visível (532 nm) ou por fluorescência em (λ_{ex} 515nm e λ_{em} 553 nm) (Figura 6). Esta análise tem sido realizada em diversos estudos (JANERO, 1990; ALMEIDA et al., 2003; DJURIC et al., 2015), mas a reação pode não ser específica, pois outros aldeídos podem também reagir com o TBA gerando artefatos. Ainda, durante o aquecimento sob elevada temperatura pode haver produção adicional de MDA, as vezes levando a superestimação dos níveis corretos de MDA na amostra. Entretanto este método é utilizado rotineiramente por ser simples e quantificar o MDA “total” dentro do organismo, pois o aquecimento rompe as ligações do MDA com outras moléculas (LIMA; ABDALLA, 2001) e a adição de antioxidantes sintéticos como o butilado de hidroxitolueno (BHT) pode prevenir a produção artefactual de MDA adicional durante o preparo das amostras.

Figura 6: Formação de aduto fluorescente da reação entre malondialdeído (MDA) e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) via catalise ácida com mecanismo de adição nucleofílica.



Outro meio analítico de estimação dos níveis de peroxidação lipídica é quantificar o MDA que está na sua forma “livre”, ou seja, que não esteja ligado com outras biomoléculas (formando adutos de lisina, por exemplo). Nessa análise não há a necessidade de aquecimento da amostra, sendo eficaz para avaliar o MDA livre no tecido, utilizando o próprio comprimento de onda que a molécula de MDA absorve, 264 nm (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Este ensaio não é muito utilizado devido à complexidade da amostra biológica, pois mesmo utilizado separação das substâncias presentes na amostra biológica por cromatográfica no HPLC-UV, ainda assim, há substâncias que absorvem no mesmo comprimento de onda do MDA gerando vários picos próximos, dificultando sua separação e quantificação.

1.3. Metabolismo do MDA

A capacidade de reação do MDA com biomoléculas depende do balanço entre a sua formação e sua degradação (JANERO, 1990). Estudo realizado por Siu e Draper (1982) mostraram que após exposição de ratos alimentados com MDA com carbono marcado radioativamente, aproximadamente 70% da dose oral foi eliminada na respiração na forma de dióxido de carbono dentro de 12 horas, sugerindo que o MDA é rapidamente consumido in vivo. Também nesse estudo, uma fração menor foi eliminada na urina e fezes. Assim é sabido que além de reagir com biomoléculas, o MDA pode ser excretado.

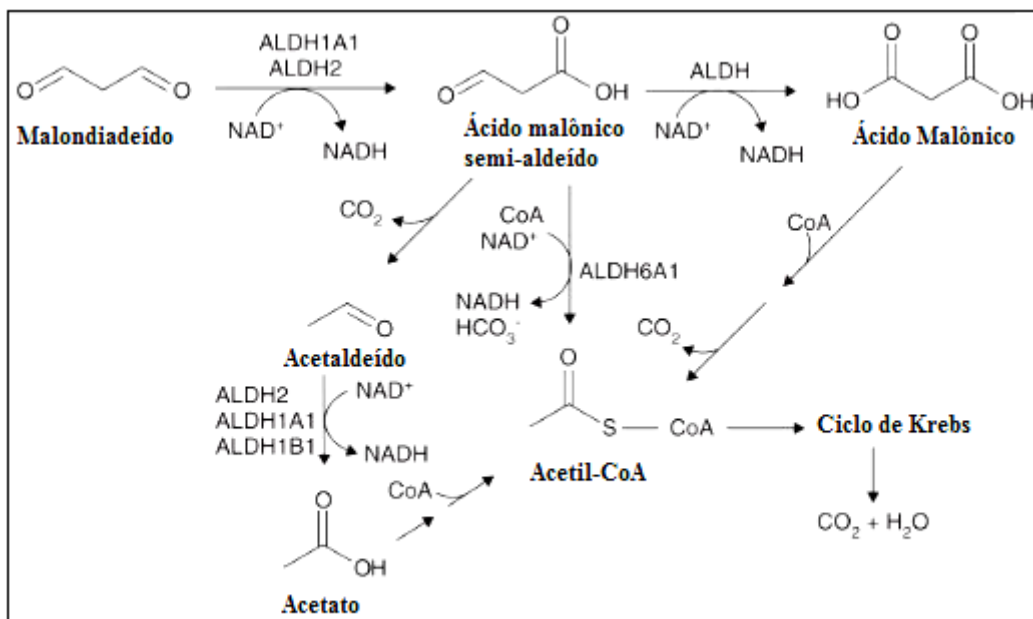
Ainda que a avaliação do MDA seja corriqueira em estudos ambientais como biomarcador de estresse oxidativo causado por poluentes, em quase todos os casos espera-se que caso haja estresse oxidativo os níveis do MDA estejam elevados. Entretanto inúmeros estudos apresentam também diminuição dos níveis de MDA de animais expostos. Geralmente se atribui essa diminuição em virtude da ativação de defesas antioxidantes nos animais, de forma a prevenir as lesões oxidativas, ainda que muitas vezes os dados de atividade antioxidante não corroborem tais explicações. A atuação das enzimas antioxidantes evita o aumento da quantidade de MDA, visto que previnem o ataque das ERO nas membranas lipídicas. Assim, é plausível sugerir que diminuições nos níveis de MDA em animais expostos a contaminantes em relação a animais controle (GÉRET, et al., 2002; SÁEZ, et al., 2013; FELÍCIO et al., 2015) poderiam estar relacionados a um aumento substancial das defesas antioxidantes decorrentes da intoxicação de tal forma a causar uma superproteção do tecido ao ponto dos níveis de MDA estarem mais baixos que animais saudáveis não expostos a poluentes.

Ainda que tais suposições possam de fato ser verdadeiras, existem poucas ou nenhuma evidência concreta que comprovem que eventuais diminuições nos níveis de MDA em animais tratados com certos contaminantes aquáticos, sejam decorrentes de uma significativa indução de enzimas antioxidantes. A princípio faz sentido pensar que aumentos na produção de ERO pudessem levar a aumentos nos níveis de MDA, e que quando isso não ocorre, estaria relacionado a sistemas de defesa eficazes a nível basal ou aumentados em resposta aos contaminantes, de tal forma que impedissem o aumento da peroxidação lipídica, ou até mesmo diminuíssem os níveis de MDA pré-existentes. No entanto, a pergunta que trazemos nesse trabalho é se não haveria a possibilidade de que os níveis de MDA aumentados em função do ataque pelas ERO pudessem estimular sistemas de detoxificação do mesmo dentro da célula. Ainda que as defesas antioxidantes pudessem ter um papel protetor evitando a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, evitando a formação do MDA. É possível que o MDA formado possa ativar outros sistemas bioquímicos das células no intuito de degradar o mesmo, ou ativar sistemas de excreção do MDA, fazendo com que seus níveis celulares diminuam de forma mais eficaz, o que poderia ser uma explicação alternativa para a observação de diminuições significativas nos níveis de MDA em animais expostos a contaminantes em muitos trabalhos científicos.

Em mamíferos, é sabido que o MDA pode ser metabolizado nas células por aldeído desidrogenases (ALDH) citosólicas (HJELLE; PETERSEN, 1983). Sabe-se que em humanos a ALDH é uma superfamília que consiste em 19 genes, encontradas em regiões subcelular incluindo citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, sendo que várias isoformas podem estar no mesmo compartimento (MARCHITTI, et al., 2008). O MDA pode ser oxidado pela ALDH até Acetil-CoA e, após passar no ciclo de Krebs, a CO₂. (Figura 7).

Apesar das ALDH mitocondriais também atuarem na metabolização de uma série de aldeídos, estudos demonstraram que estas são fortemente inibidas pelo MDA em excesso, indicando que seu papel na metabolização do MDA pode não ser significativo (HJELLE; GRUBBS; PETERSEN, 1982), mesmo que tais estudos tenham sido realizados apenas em mamíferos. Assim, sugere-se que as ALDH citosólicas teriam maior papel na metabolização de aldeídos provenientes da peroxidação lipídica.

Figura 7: Esquema da metabolização do MDA por isoformas da ALDH (Adaptado de Marchitti e colaboradores (2008)).



É sabido que *in vivo* o MDA pode reagir com resíduos de lisina das proteínas formando o aduto *N*-ε-(2-propenal)lisina (NPL), o qual tem sido também detectado em tecidos, fluídos e urina de mamíferos como indicativo de lesões a proteínas decorrentes da PL (GIRON-CALLE, et al., 2002). Ainda que não haja evidência da formação desses compostos em animais aquáticos, é possível que esses metabólitos sejam também

formados em peixes, podendo ser encontrados nos tecidos e fluídos corpóreos, ou ainda sejam excretados do organismo por meio das brânquias. Nesse ponto, ressalta-se que os principais órgãos de trocas gasosas dos animais aquáticos, as brânquias, possuem contato direto com a água, e uma possibilidade adicional para o metabolismo do MDA ainda não sugerida poderia ser a direta difusão do MDA pela superfície epitelial das brânquias para a água.

Uma rota responsável por diminuir a quantidade de MDA é via carnosina. A carnosina (Carnosina (b-alanil-L-histidina) é um dipeptídeo que está presente nos animais invertebrados, como peixes (GEDA et al., 2014), possuindo capacidade antioxidantes. Um estudo recente mostrou que ela foi capaz de diminuir a quantidade de MDA em uma exposição em ratos administrados com carnosina comparado com o grupo controle (HASANEIN; KAZEMIAN-MAHTAJ; KHODADADI, 2016), podendo ser uma rota de eliminação do MDA.

Nossa hipótese é que contrariamente do que dizem alguns autores, de que a diminuição do MDA, em animais expostos a contaminantes, esteja relacionada com os aumentos significativos das enzimas antioxidantes de forma que evite a peroxidação lipídica, é que estas diminuições estejam relacionadas com o seu catabolismo e excreção na água.

Em animais aquáticos, pouco se sabe sobre o metabolismo do MDA. O presente trabalho, objetivou estudar esse metabolismo por meio da avaliação da ALDH, MDA, enzimas antioxidantes (GPx, CAT e G6PDH), enzima de biotransformação GST, peróxidos lipídicos (FOX), GSH total em lambaris expostos a biodiesel, os metais cádmio (Cd) e cobre (Cu) e expostos a do intraperitonealmente.

Objetivos

2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivo avaliar se possíveis decréscimos nos níveis de MDA em peixes expostos a contaminantes ambientais pode ter relação com aumentos na atividade de defesas antioxidantes, aumentos na atividade da ALDH ou excreção direta do MDA na água.

De forma a melhor cumprir com esses objetivos gerais, os mesmos foram subdivididos nas seguintes etapas:

- Verificar a relação entre quantidade de MDA e as atividades das enzimas (CAT, GPx, GST, G6PDH e ALDH) em amostras de brânquia e fígado de *Astyanax altiparanae* contaminados por biodiesel B5 nas concentrações (0,001 mL/L, 0,01 mL/L e 0,1 mL/L) e mistura dos metais cádmio e cobre (40 mg/L e 100 mg/L).
- Avaliar o efeito do MDA em brânquia e fígado de *Astyanax altiparanae* injetados nas doses 10 mg/kg e 100 mg/kg de MDA após 5 dias.
- Avaliar a metabolização de MDA em brânquia e fígado *Astyanax altiparanae* injetados nas doses 10 mg/kg de MDA após zero, uma e 12 horas de exposição e se houve excreção deste aldeído.
- Verificar a relação do MDA as enzimas CAT, GPx, GST, G6PDH e ALDH, em um teste *in vitro* em amostras de brânquia e fígado nas concentrações 100 mM, 10 mM, 1mM, 100 µM e 10 µM.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Lambari

A sensibilidade de um organismo frente ao contaminante pode ser a nível bioquímico, fisiológico, morfológico e comportamental. De modo que a sensibilidade está relacionada também com nível de nutrição, idade, sexo, fase de desenvolvimento entre outras (MAGALHAES; FERRAO-FILHO, 2008), muitas são as variáveis a se considerar na escolha de um organismo teste. Ao selecionar um organismo teste para avaliar os efeitos biológicos dos poluentes, vários fatores devem ser considerados, incluindo abundância e disponibilidade, conhecimento da biologia, fisiologia, hábitos alimentares, sensibilidade constante e apurada, facilidade de cultivo em laboratório e se possível a espécie deve ser nativa na área estudada. (RAND; PETROCELLI, 1995).

O lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) (Figura 8) está alocado no Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Classe Osteichthyes, Subclasse Actinopterygii, Ordem Characiformes e Família Characidae (NELSON, 1994; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). *Astyanax altiparanae* apresenta grande diversidade de microambientes. Considerada como uma espécie oportunista, ela utiliza várias estratégias na estrutura de sua população, possuindo uma elevada plasticidade alimentar, bem como sua capacidade de reprodução em vários ambientes. Explicando o sucesso desta espécie na colonização de novos habitats (DOMINGUES, 2000).

O lambari representa um modelo de peixe comumente utilizado em estudos de biomonitoramento de poluição aquática, várias respostas histológicas (SILVA;

MARTINEZ, 2006), fisiológicas (SCHULZ; MARTINS-JUNIOR, 2001) e bioquímicas (SANCHES, 2004) tem sido relacionada a exposição deste organismo a poluentes.

Figura 8: Organismo modelo: *Astyanax altiparanae*.



Os lambaris foram obtidos em loja comercial de isca para pescaria, na cidade de São José do Rio Preto, SP. Os peixes foram distribuídos em tanques de 350 litros onde permaneceram por um período de 15 dias de aclimatação antes dos experimentos, durante este período, foram alimentados diariamente com ração e mantidos a temperatura de 30 °C e aeração constante (Figura 9).

Figura 9: Tanque de aclimação



3.2. Indução do estresse oxidativo por poluentes modelo

Para preparo destas soluções, foi utilizada a massa nominal, levando em consideração a quantidade de metal e não do sal. Os sais foram pesados separadamente, (para a concentração de $40\mu\text{g/L}$ foi pesado $40\ \mu\text{g}$ de cada metal por litro), em seguida os sais foram misturados e uma prévia diluição foi realizada em água (solução estoque) antes de finalmente serem distribuídos nos aquários. A solução de B5 estava previamente preparada. As concentrações finais foram alcançadas diluindo o B5 diretamente nos aquários. As concentrações foram escolhidas de acordo com trabalhos anteriores do grupo.

Para execução experimental, lambaris de ambos os sexos, com tamanho médio de $7,55\pm 1,1$ cm e massa $13,49\pm 6,3$ g, foram distribuídos em sete grupos de 20 animais cada, distribuídos de quatro em quatro em aquários de contendo 18 litros de água ($N=5$,

sendo 5 réplicas por tratamento constituídas de 4 animais cada) com aeração constante e sem troca de água. Um dos grupos recebeu água sem contaminantes, sendo denominado o grupo controle do experimento, ao passo que os cinco grupos restantes foram divididos em dois conjuntos, sendo um deles constituído de dois subgrupos que receberam concentrações crescentes de uma mistura da solução estoque de metais a 40 e 100 µg/L. O outro constituiu-se de três grupos que receberam água contendo concentrações crescentes de B5 a 0,001, 0,01 e 0,1 mL/L (Figura 10). Ao final de cinco dias de exposição, os animais foram coletados, anestesiados por imersão em água com 100 mg/L de benzocaína e tiveram seus fígados e brânquias coletados e congelados a -80° C para posteriores análises bioquímicas. Amostras de água dos aquários foram coletadas para avaliação dos níveis de MDA. O pH, nitrogênio e oxigênio estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 1).

Figura 10: Esquema do experimento de indução do estresse oxidativo por poluente modelo em *Astyanax altiparanae*

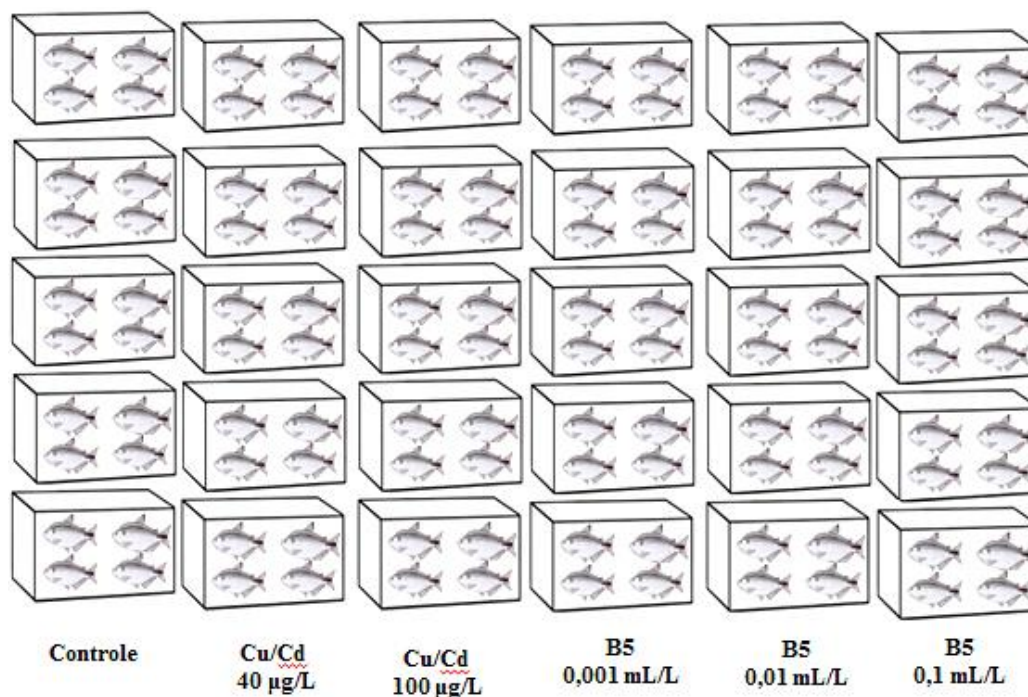


Tabela 1: Parâmetros físico-químicos no experimento de indução ao estresse oxidativo por poluente modelo em *Astyanax altiparanae*.

Dias	Parâmetros	Valores
5	Nitrogênio total (mg/L)	12,26 ± 6,16
	pH	7,46 ± 0,22
	Oxigênio (ppm)	4,78 ± 0,73

3.3. Avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes

3.3.1. Experimento de 5 dias

Lambaris de ambos os sexos, com tamanho médio de $7,42 \pm 0,9$ cm e massa $13,69 \pm 4,7$ g, foram divididos em 3 grupos de 20 animais cada, distribuídos em aquários individuais contendo 4 L de água cada, com aeração constante (Figura 12). Cada quatro aquários representou uma réplica de um total de cinco réplicas por grupo. Um grupo de cinco réplicas foi considerado grupo “controle” do experimento e os animais foram injetados intraperitonealmente com solução salina sem adição de contaminante na água. Os outros dois grupos também receberam água sem contaminante, porém os peixes foram injetados intraperitonealmente com doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg do MDA diluído em solução salina (Figura 11). Durante o experimento os animais não foram alimentados. Ao final de cinco dias de exposição, os animais foram coletados, anestesiados por imersão em água com 100 mg/L de benzocaína e tiveram seus fígados e brânquias coletados e congelados a -80 °C para posteriores análises bioquímicas. Não houve troca de água durante o experimento; pH, nitrogênio e oxigênio estão apresentados na tabela 2.

Figura 11: Esquema de montagem de experimento de 5 dias com injeção intraperitoneal de MDA com dose de 10 e 100 mg/kg em *Astyanax altiparanae* para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes

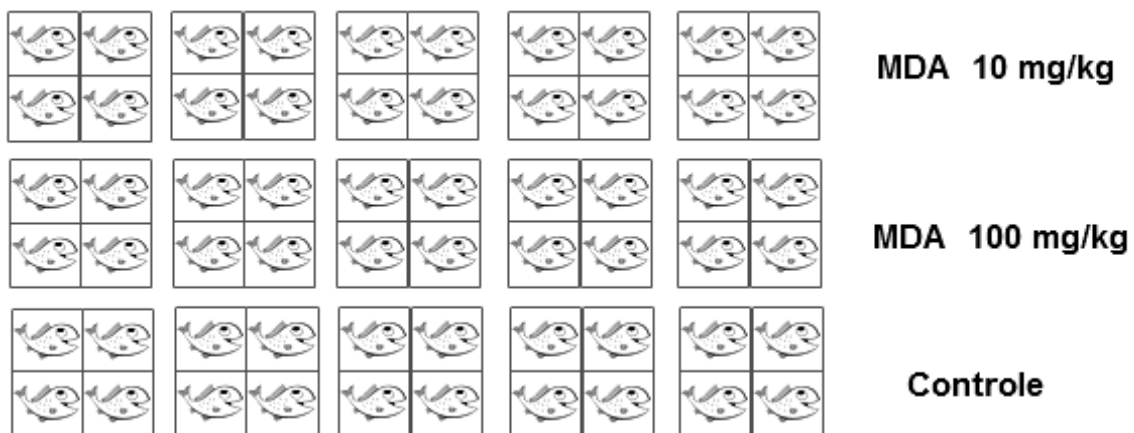


Figura 12: Disposição dos aquários no experimento de 5 dias com injeção intraperitoneal de 10 e 100 mg/kg de MDA em poluente modelo em *Astyanax altiparanae*, para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes



Tabela 2: Parâmetros físicos-químicos no experimento de teste de concentração em *Astyanax* sp.

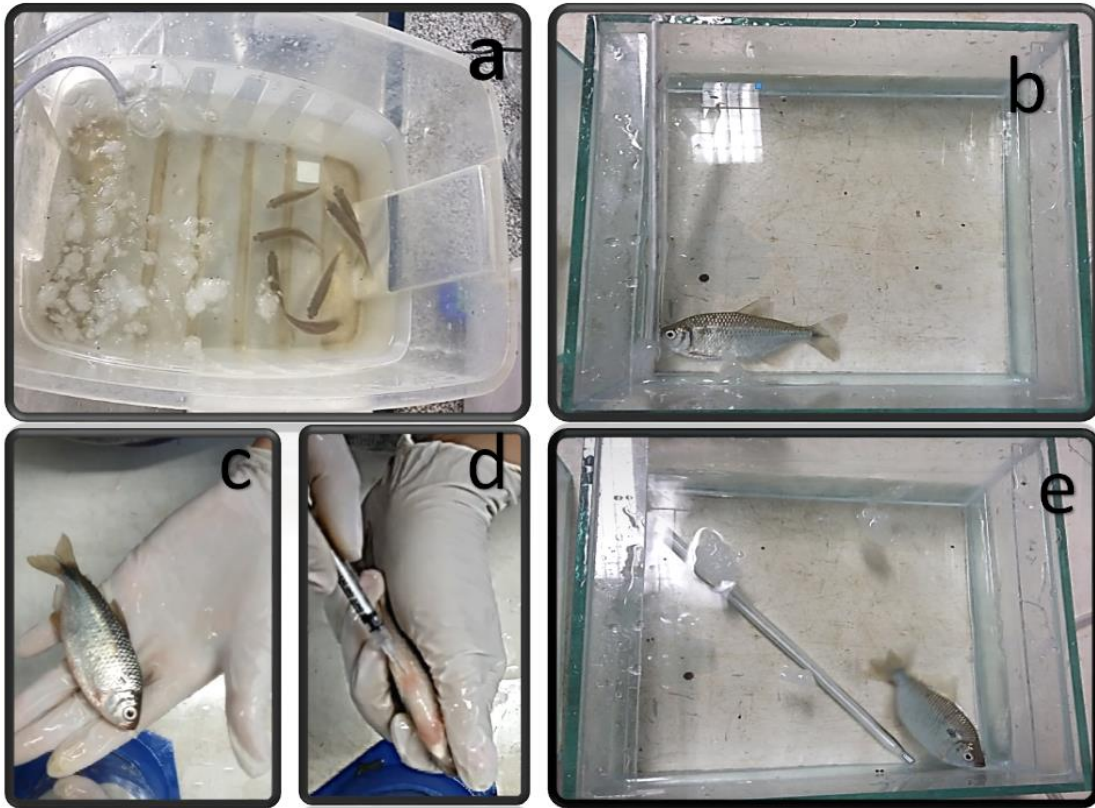
Dias	Parâmetros	Valores
5	Nitrogênio total (mg/L)	4,48 ± 2,61
	pH	7,76 ± 0,16
	Oxigênio (ppm)	4,25 ± 0,58

3.3.2. Experimento de 12 horas

Lambaris de ambos os sexos, com tamanho médio de $7,63 \pm 0,8$ cm e massa $12,27 \pm 5,1$ foram divididos em 3 grupos de 20 animais cada, distribuídos em aquários individuais contendo 4 L de água cada, com aeração constante (Figura 14). Cada quatro aquários representou uma réplica de um total de cinco réplicas por grupo. Todos os animais do grupo foram injetados intraperitonealmente com uma dose de MDA de 10 mg/kg (Figura 13), entretanto, o tempo de coleta destes animais foram diferentes. Um

grupo considerado “grupo zero” do experimento foi coletado após receber a dose MDA. Outro grupo foi retirado 1 hora após receber a dose e o terceiro grupo após 12 horas. Para a coleta, os animais foram anestesiados por imersão em água com 100 mg/L de benzocaína e tiveram seus fígados, brânquias e sangue coletados e congelados a -80 °C para posteriores análises bioquímicas. Nestes tempos experimentais foram coletadas água para avaliar a excreção do MDA. O pH e oxigênio estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 3).

Figura 13: Sequência de procedimentos para injeção intraperitoneal de MDA com dose de 10 mg/kg em *Astyanax altiparanae* para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes no experimento de 12 horas



Nota: Para realizar os experimentos com injeção intraperitoneal de uma dose de 10 mg/kg de peixe de MDA, os lambaris após período de aclimação foram capturados e separados em caixas. Após a separação, foi adicionado gelo na caixa para que a temperatura começasse a abaixar até 18 °C (a). Dois outros recipientes foram preparados, um com água filtrada a temperatura de 12 °C (b) e outro com 20 °C (c). Após preparo, pegou-se o peixe da caixa (a), colocou-o a 12 °C (b) até seu metabolismo abaixar ao ponto de ficar imóvel, em seguida injetou-se a dose de MDA (c, d) e colocou-o na caixa individual a 18 °C para que seu metabolismo começasse a subir lentamente em seguida o peixe foi transferido para o aquário individual onde permaneceu durante todo o experimento.

Figura 14: Esquema de montagem de experimento de 12 horas com injeção intraperitoneal de MDA com dose de 10 mg/kg em *Astyanax altiparanae* para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes



Figura 15: Disposição dos aquários no experimento de 12 horas com injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de MDA em poluente modelo em *Astyanax altiparanae*, para avaliação do efeito do MDA na atividade de enzimas antioxidantes



Tabela 3: Parâmetros físicos-químicos no experimento de 12 horas com injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de MDA em poluente modelo em *Astyanax altiparanae*.

Tempo	Parâmetros	Valores
12 horas	pH	7,21,46 ± 0,51
	Oxigênio (ppm)	5,72 ± 0,6

3.4. Experimento in vitro

Os lambaris foram anestesiados por imersão em água com 100 mg/L de benzocaína e tiveram fígado, brânquia coletados. Após a coleta, os tecidos foram homogeneizados (1:4, massa:volume) em tampão de homogeneização Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 mol/L, KCl 0,15 M e 1 mM de Fenilmetanosulfonyl fluoreto (PMSF), centrifugados durante 20 minutos a 10 000 g. A fração sobrenadante foi coletada e novamente centrifugada a 50.000 g durante uma hora. A fração citosólica foi então distribuída em 5 ependorfs, cada um recebeu 200 µL de amostra e posteriormente receberam uma solução de MDA para obter uma concentração final de MDA de 100 mM, 10 mM, 1mM, 100 µM e um controle sem adição de MDA, estas soluções foram utilizadas para análise GST, GPx, CAT, G6PDH e proteína.

Para análise da atividade da ALDH, amostras de fígado foram homogeneizadas em 5 volumes de tampão fosfato de potássio 30 mM pH 7,5. Após homogeneização com mixer as amostras foram centrifugadas a 10 000 g durante 10 min. O sobrenadante foi dividido em 11 ependorfs e adicionado uma solução de MDA de modo que a concentração final deste aldeído fosse, 100 mM, 10 mM, 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM e 1 pM e um controle sem adição de MDA (30 T).

Após adição de MDA, todos os tubos, foram colocados em banho-maria a 30 °C durante 5 minutos, para simular a temperatura ideal de aclimatação do lambari, Ao final, os tubos foram para gelo e seguido protocolo para cada análise como descrito nos itens subsequentes.

3.5. Análises bioquímicas

3.5.1. Quantificação de MDA

Para amostras de brânquia e fígado do experimento de exposição o MDA foi detectado pela presença do produto formado entre o MDA (produto da peroxidação) e o ácido 2- tiobarbitúrico (TBA), via HPLC-UV em 532 nm (ALMEIDA et al., 2003, 2004). A homogeneização de 100 mg de amostras de fígado e brânquia em 300 µL de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 foi adicionado 300 µL de solução de ácido 2- tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2 M. Posteriormente amostras foram incubadas por 40 minutos a 90 °C. Após este período, as amostras de MDA-TBA foram extraídas com 1 mL de n-butanol após centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos. No sistema cromatográfico, as amostras de MDA-TBA foram injetadas diretamente (20 µL) e monitoradas a 532 nm a 40°C. A fase móvel constituiu-se de uma solução de fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% metanol (v:v), bombeada sob fluxo isocrático (1 mL/min). A coluna utilizada foi uma LC-18 (150 x 4,6 mm, 5µm de diâmetro de poro). A quantificação do MDA foi realizada com base em uma curva padrão, injetando-se previamente no HPLC concentrações conhecidas de padrões autênticos de MDA derivatizados com o TBA, de acordo com o protocolo supracitados os dados foram expressos em pmol de MDA/mg de tecido.

3.5.2. Glutathiona total (GSH-t)

A quantificação da GSH-t foi realizada por método espectrofotométrico em 412 nm por 4 minutos. Inicialmente um “MIX” foi preparado contendo Tampão fosfato de potássio 0,25 M pH 7, água, NADPH 100 mM e DTNB 5 mM. Na curva analítica foram utilizados água, glutathiona oxidada e o “MIX” para produzir concentrações

equivalentes a 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 1,2 de GST-t. Para o preparo das amostras: 50 mg de tecido foram homogeneizados com 450 μ L de PCA 0,5 M, seguido de centrifugação por 2 min a 15 000 x g. Em seguida o sobrenadante foi coletado e neutralizado com 450 μ L de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. No ensaio, foi adicionado na cubeta 400 μ L de "MIX", 75 μ L de amostra e 25 μ L de GR 5U/L. Os resultados obtidos foram expressos em nmol/g de tecido (AKERBOOM; SIES, 1981).

3.5.3. Hidroperóxidos Lipídicos (FOX)

Para quantificação dos hidroperóxidos lipídicos, foi utilizado a homogeneização para as enzimas como descrito no item (3.4.7.), 100 μ L de amostra sobrenadante de fígado e brânquia foram adicionados a 100 μ L de TCA 12 %, após agitação esta mistura foi centrifugada a 5 000 rpm durante 10 min a 4 °C. 100 μ L do sobrenadante foram retirados para análise da FOX. Duas soluções padrão foram previamente preparadas de hidróxido de cumeno em água a 1 mM (S I) e 0,004 mM (SII) que foram posteriormente diluídas em metanol 90 % (v:v) formando sete pontos da curva. O volume de 900 μ L da mistura reativa composta de; 0.0081 g de xilenol, 0.0098 g de BHT, 150 μ L de ácido sulfúrico e 0.011 de sulfato de ferro II foram adicionadas a 100 μ L dos sete pontos da curva assim como, 100 μ L de sobrenadantes das amostras. Para completar a reação, os tubos com a mistura foram levados para o escuro durante 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, a FOX foi quantificada em UV- Vis com leitor de microplacas em 560 nm. (Os dados foram expressos em nmol/mg de tecido) (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991).

3.5.4. Atividade da aldeído desidrogenase (ALDH)

A atividade da ALDH foi medida em amostras de fígado, sem separação da fração citosólica e microsomal, por meio da conversão de acetaldeído para ácido acético. O preparo foi realizado por meio da homogeneização de 50 mg de amostra em 250 µL tampão fosfato de potássio 30 mM pH 7,5. Após homogeneização com mixer as amostras foram centrifugadas a 10 000 g durante 10 min. O meio da reação conteve 100 mM Tampão Tris - HCl (pH 8,5) , 1 mM de NAD⁺ , 1 mM de pirazol, 1 mM de acetaldeído com volume final de 500 µL. A atividade de ALDH foi avaliada na fração total (citosólica e microsomal) à temperatura ambiente monitorando a formação de NADH a partir de NAD⁺ a 340 nm monitorada por 10 minutos (SYDOW et al., 2004 com modificações).

3.5.5. Preparo das amostras para análise das enzimas GST, GPx, G6PDH e CAT

As amostras de tecido (brânquia e fígado) foram homogeneizadas (1:4, massa:volume) em tampão de homogeneização Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, sacarose 0,5 mol/L, KCl 0,15 M e 1 mM de Fenilmetanosulfonil fluoreto (PMSF), centrifugados durante 20 minutos a 10 000 g. A fração sobrenadante foi coletada e novamente centrifugada a 50.000 g durante uma hora. A fração citosólica foi coletada para análises das atividades enzimáticas CAT, GPx, G6PDH, GST e quantificação de proteína.

3.5.5.1. Análises de proteína

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976) na fração citosólica coletada, após homogeneização e centrifugação dos órgãos dos animais.

3.5.5.2. Ensaio da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, através do decréscimo de absorvância em 240 nm . Para isso, foi adicionado 10 µL de amostra em 990 µL de meio de reação (pH 8,0) composto por tampão Tris 1 M contendo EDTA 5 mM e peróxido de hidrogênio 10 mM. Os resultados estão expressos em U/ mg de proteína.

3.5.5.3. Ensaio da Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi avaliada pelo método de Keen, Habig e Jakoby (1976). A amostra adicionada ao meio de reação contendo tampão fosfato de Potássio 0,1 M, pH 6,5, 100 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), e 100mM de GSH. O aumento da absorvância é acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm. Os resultados estão expressos em U/ mg de proteína.

3.5.5.4. Ensaio da Glutathione peroxidase (GPx)

A análise da GPx foi feita pela técnica de Sies et al. (1979). Este método se baseia na medida do decréscimo de absorvância a 340 nm, promovido durante a redução da glutathione oxidada (GSSG). A redução é catalisada por glutathione redutase (GR) em presença de NADPH. O meio de reação contém tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,0, NADPH 20 mM, GR 0,1 U/ml e glutathione reduzida 0,1 M. Os resultados estão expressos em mU/mg de proteína.

3.5.5.5. Ensaio da Glicose – 6- fosfato- desidrogenase (G6PDH)

Na presença de glucose-6-fosfato, o NADPH é formado a partir de NADP⁺ e, dessa forma, o aumento da absorvância é medido em 340 nm ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) pelo método de Glock; McLean (1953). O ensaio enzimático é realizado em tampão TRIS/HCl 0,1mM. pH 7.4 contendo NADP⁺ e cloreto de magnésio (MgCl₂). Como substrato iniciador utiliza-se 1,5mM de glicose-6-fosfato (G6P). A absorvância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência de G6P. Os resultados estão expressos em U/mg de proteína.

3.6. Análise estatística

Inicialmente foi aplicado teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (Levene) para todos os dados obtidos. Se os dados foram paramétricos, foi aplicado Anova One-Way seguido do teste de Fisher LSD. No caso de dados não normais ou não homogêneos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas foram aceitas somente para $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com ajuda do programa Statistica 7.1. Para análise de correlação foi utilizado correlação de Spearman uma vez que os dados foram não paramétricos.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

Muitos estudos avaliam os níveis de MDA em peixes, como indicador de peroxidação lipídica decorrente de efeitos negativos e estresse oxidativo gerado pela exposição a diversos poluentes aquáticos (VALAVANIDIS et al., 2006; FAROMBI; ADELOWO; AJIMOKO, 2007; MONERÓ; RODRIGUES; ALMEIDA, 2013; AKPAKPAN et al., 2014; ZEID, KHALIL, 2015). Em geral, aumentos nos níveis de MDA são observados como resultado do estresse oxidativo, entretanto, em alguns casos, diminuição significativa dos níveis de MDA são observadas em animais expostos a certos contaminantes ambientais como diesel e biodiesel (FELÍCIO et al., 2015), chumbo e urânio (LABROT et al., 1996), cádmio, cobre e mercúrio (GÉRET et al., 2001) em relação a animais controle não expostos. Na grande maioria dos casos, os autores sugerem que essas diminuições possam estar relacionadas a aumentos significativos na atividade de enzimas antioxidantes, de forma a evitar substancialmente a peroxidação lipídica, fazendo diminuir os níveis de MDA ao longo do tempo. Porém, na grande maioria das vezes, essa sugestão não é suportada pelos dados experimentais. Uma outra hipótese, levantada por nosso grupo, é de que eventuais diminuições nos níveis de MDA poderiam estar associadas ao seu metabolismo por enzimas aldeído desidrogenases ou sua eliminação por excreção, tal como observado em mamíferos (MCGIRR; HADLEY; DRAPER, 1985; KIM, et al., 2014). Para investigar possíveis rotas do metabolismo do MDA os animais foram expostos a mistura de metais (Cd e Cu) e B5.

No presente trabalho, os animais expostos a misturas de Cu e Cd não apresentaram alterações na quantidade de MDA no fígado (Figura 20), não permitindo avaliar a relação entre a produção desse aldeído na peroxidação lipídica e o papel da

aldeído desidrogenase, que também não se alterou após exposição aos metais (Figura 20). Além disso, não provocaram PL na brânquia (Figura 18) e no fígado (Figura 19), tendo visto pelo ensaio da FOX (os peróxidos lipídicos se mantiveram estatisticamente com relação ao grupo controle) e os metais também não foram capazes de ativar a ALDH (Figura 20) de modo que nesses grupos não houve diferença estatística com relação ao grupo controle. Por outro lado pode ser que outros mecanismos de defesa antioxidante ou de metabolismo do MDA atuaram de forma a evitar aumento do MDA. Estudos recentes com mexilhões verificaram que os metais cobre e ferro nas concentrações 40 e 500 µg/L após 120 horas estimularam a PHGPX, causando proteção contra a PL (ALMEIDA, et al., 2004).

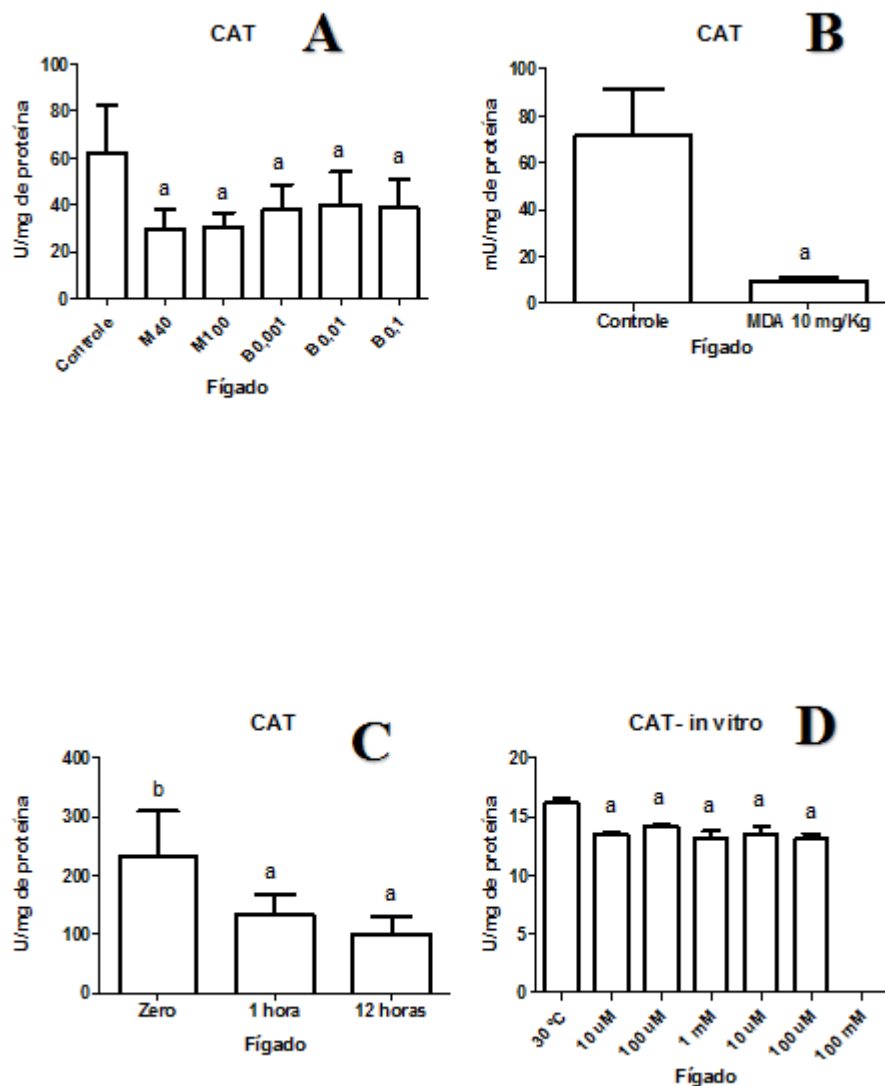
É sabido que o Cu é importante elemento na manutenção das funções fisiológicas, tais como, sistema nervoso, cardiovascular, hematológico e reprodutivo, entretanto acredita-se que sua maior função esteja relacionada às metalotioneínas, tal como a superóxido dismutase, importante enzima antioxidante (HEFNAWY; EL-KHAIAT, 2015). Já o Cd não faz parte do metabolismo e pode provocar efeitos deletérios, interferindo no funcionamento das enzimas, podendo até se ligar a seus cofatores, entretanto em quantidades elevadas, ambos metais podem provocar estresse oxidativo se ultrapassada a quantidade suportada pelo organismo, (KHALID et al 2015) embora a toxicidade do Cu seja mais elevada comparada ao Cd ($L_{50\ 96h} = 3,53\text{ mg L}^{-1}$ para Cu e $20,13\text{ mg L}^{-1}$ para Cd em teste em *Oreochromis niloticus*) (SILVA, 2013).

Romeo e colaboradores (1999) avaliaram a bioacumulação destes metais (Cd e Cu) injetados em *Dicentrarchus labrax*, mostrando que Cu foi mais bioacumulado no fígado, o que geralmente está relacionado com a indução da metalotioneína neste tecido, enquanto que o Cd estava em quantidade maior no rim. Este trabalho ainda avaliou a relação da catalase com esses metais *in vitro*, e observou, assim como em nosso

trabalho, uma diminuição de sua atividade, supondo ser resultado de uma ligação direta do cádmio com resíduos de sulfidrilas uma vez que o cádmio tem afinidade com -SH. Esta diminuição da catalase, também foi encontrada por Palace e colaboradores (1992) ao expor truta arco-íris a cádmio. Assim, em nosso trabalho, podemos inferir que a diminuição da catalase no fígado nas duas concentrações utilizadas (figura 16) possa estar relacionada com este metal ainda que esteja em menor quantidade comparado com o cobre.

A atividade da Catalase, em amostras de fígado de *Astyanax altipanae* deste estudo, diminuiu em todos os ensaios realizados (Figura 16), frente aos metais, todas as concentrações de biodiesel e com injeção de uma dose de MDA nos tempos de 1 hora, 12 horas e 5 dias. Por fim foi comprovado por meio do ensaio em *in vitro*, que o MDA inibe a atividade da catalase em todas as concentrações testadas. Assim, podemos inferir que esta enzima antioxidante não contribui para a diminuição na quantidade de MDA neste estudo.

Figura 16: Atividade da Catalase em amostras de fígado de lambari *Astyanax altipanae* em diferentes tratamentos.

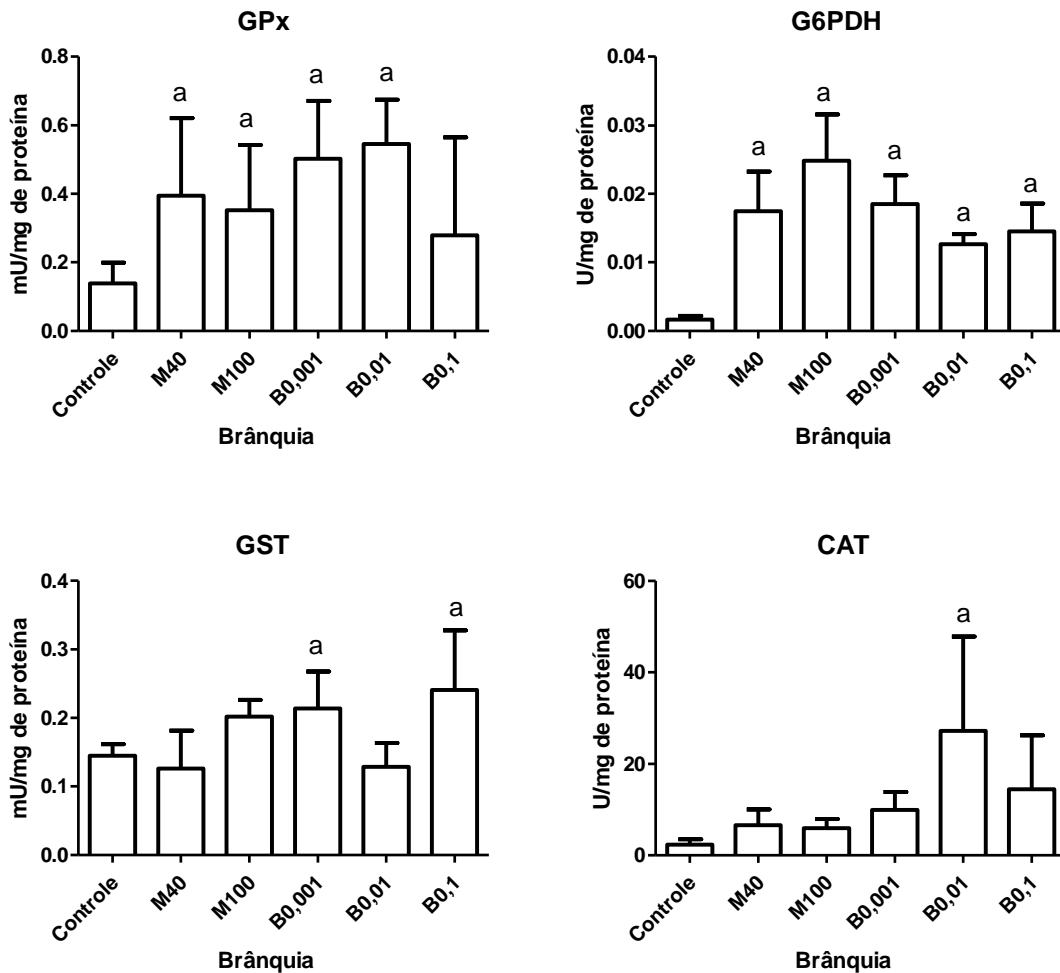


Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. **A:** exposição a a mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40µg/L (M40) e 100µg/L(M100) e B5 nas concentrações de 0,001 ml/L (B0,001), 0,01 ml/L (B0,01) e 0,1 ml/L (B0,1) após 5 dias de exposição. ^a diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (ANOVA one-way seguida por Fisher LSD) **B:** Peixes tratados com injeção intraperitoneal com solução salina (controle) e solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado) após 5 dias de exposição. ^a diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis seguido de Dunn's) **C:** Peixes tratados com injeção intraperitoneal com solução de MDA 10 mg/kg de peixe, experimento com coleta de grupo no tempo zero, uma hora e 12 horas após a exposição. ^{a,b} Letras diferentes expressam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos do próprio tecido. Letras iguais expressam semelhança entre os grupos do próprio tecido (Kruskal-Wallis seguido de Dunn's). **D:** Amostras de fígado de *Astyanax altipanae* incubados com MDA. ^a diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (ANOVA one-way seguida por Fisher LSD).

As brânquias são os primeiros alvos dos tóxicos, importante rota de captura, bioconcentração e excreção de contaminantes devido sua grande área superficial e seu contato direto com o ambiente (AMEUR, et al., 2015). Neste tecido, não foi encontrada atividade da ALDH. Assim como sugerido por Lassen e colaboradores (2005) que mostraram a distribuição da ALDH2 em tecidos como rim, coração, fígado, músculo e cérebro de zebrafish macho e não encontraram expressão desta isoforma em brânquias. Acredita-se que esta enzima seja a principal responsável por metabolizar os aldeídos da PL, entre eles, MDA (MARCHITTI, et al., 2008). A ALDH são uma superfamília de enzimas que dependem de NAD(P)⁺ e metabolizam uma grande variedade de aldeídos alifáticos e aromáticos (VASILIOU; PAPPAS; ESTEY, 2004), desde Siu e Draper (1992) que mostraram a oxidação do MDA, especialmente as isoformas ALDH1A1 e ALDH2 que convertem MDA em ácido malônico (MARCHITTI, et al., 2009).

A ausência da ALDH na brânquia poderia explicar por que nesse tecido houve aumento do MDA após exposição à maior concentração do B5 (figura 18). No entanto, nos outros tratamentos, não houve alteração dos níveis de MDA (figura 18).

Figura 17: Atividade enzimática das enzimas GPx, G6PDH, GST e CAT em amostras de brânquia de *Astyanax altiparanae*, expostos à mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40 µg/L (M40) e 100 µg/L (M100) e B5 nas concentrações de 0,001 ml/L (B0,001), 0,01 ml/L (B0,01) e 0,1 ml/L (B0,1) após 5 dias de exposição.



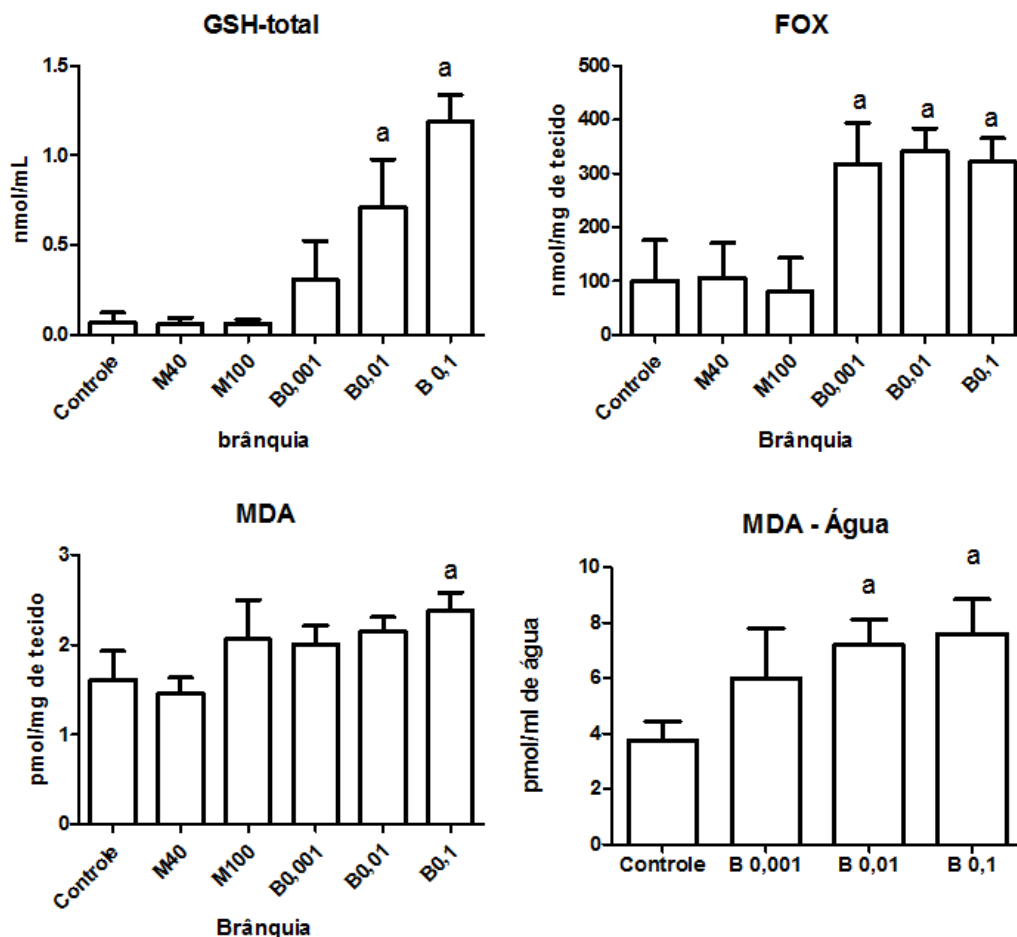
Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a Valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Para GPx e CAT foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para GP6DH e GST foi utilizado ANOVA one-way seguida por Fisher LSD como testes estatísticos.

É intrigante o fato de que os peixes não apresentarem atividade substancial da ALDH na brânquia. Uma hipótese que temos para esse fato seria devido ao contato direto das brânquias com o meio aquoso externo, ou seja, ao invés de possuir uma enzima metabolizadora de aldeídos como o fígado, a brânquia poderia estar excretando diretamente o MDA na água. Assim, podemos confirmar observando os resultados dos

peróxidos lipídicos, por meio da FOX (figura 18), que teve seus níveis aumentados em todas as concentrações de B5, que houve PL e era esperado houvesse um aumento de MDA nesses grupos, o que não ocorreu. Com base nos dados apresentados na figura 18 a respeito da FOX e MDA na brânquia e MDA na água, podemos confirmar que a brânquia eliminou o MDA produzido, pois houve um aumento significativo de MDA nas amostras de água coletadas dos aquários dos peixes expostos ao B5.

Podemos notar que, ainda que o sistema de defesa antioxidante tenha atuado, observando o aumento da GPx, CAT e G6PDH (figura 17), não foi suficiente para que proteja-se o organismo do peixe contaminado com biodiesel. Os níveis de GSH total aumentaram neste experimento nas brânquias dos peixes expostos as duas maiores concentrações de B5 (figura 18), esse aumento pode estar relacionado com o aumento da síntese de GSH utilizada na GPx e pela GST (figura 17).

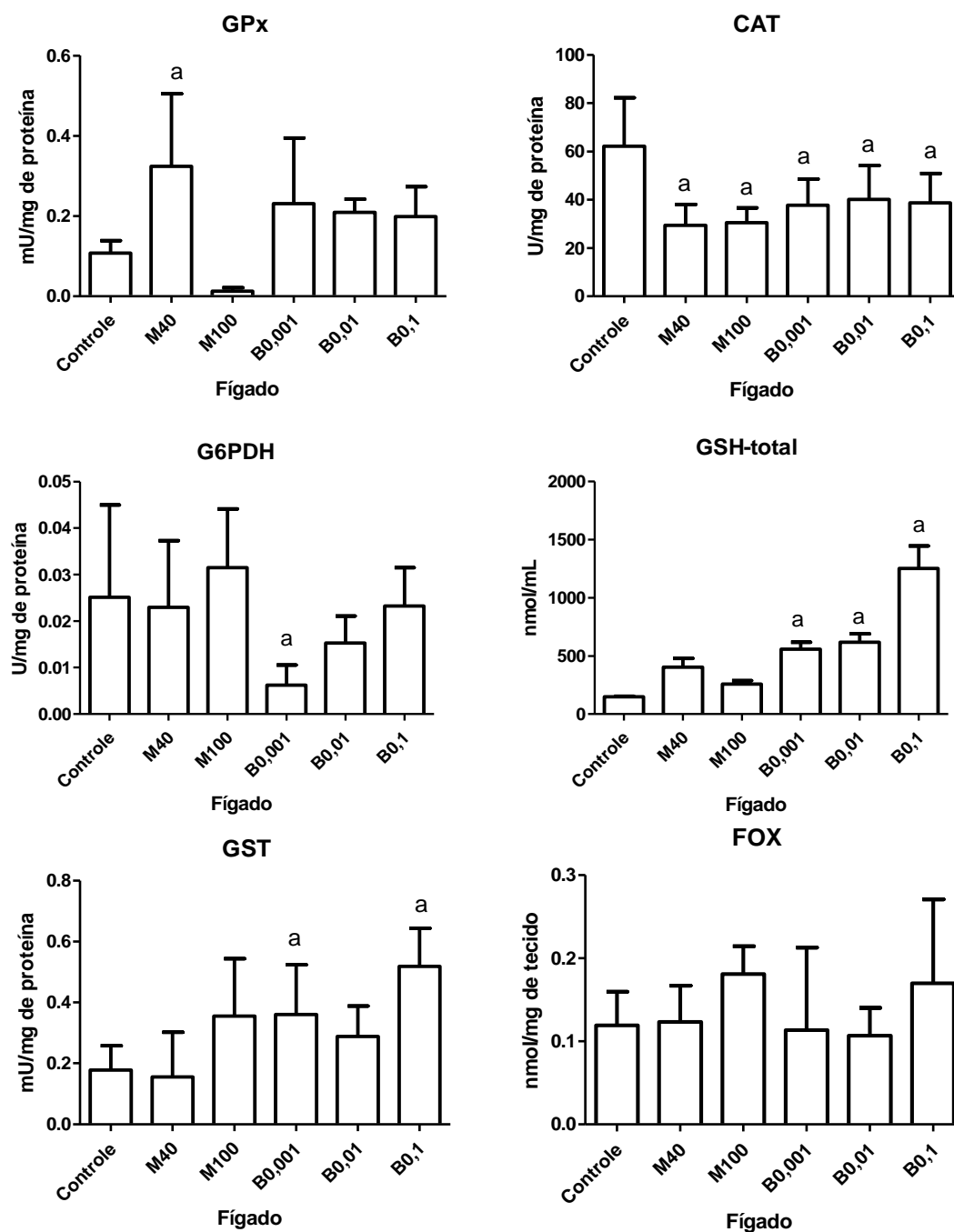
Figura 18: Parâmetros bioquímicos relacionados a níveis de GSH total, e níveis de peroxidação lipídica avaliados pela quantidade de peróxidos lipídicos (FOX) e MDA em amostras de brânquia e água de *Astyanax altiparae*, expostos a mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40 µg/L (M40) e 100 µg/L (M100) e B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1).



Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a Valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Para teste estatístico foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's.

Com relação as amostras de fígado dos animais expostos ao diesel B5, houve diminuição significativa na quantidade de MDA em animais expostos a 0,01 e 0,1 mL/L de B5 em relação ao grupo controle (figura 20), esta diminuição com relação aos derivados de petróleo já foi observada em trabalhos anteriores publicados pelo grupo (NOGUEIRA, et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2015; FELÍCIO, et al., 2015).

Figura 19: Parâmetros bioquímicos relacionados a atividades da GPx, CAT, G6PDH e GST, níveis de GSH total, e níveis de peroxidação lipídica avaliados pela quantidade de peróxidos lipídicos (FOX) em amostras de fígado de *Astyanax altiparanae*, expostos a mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40 µg/L (M40) e 100 µg/L (M100) e B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1).

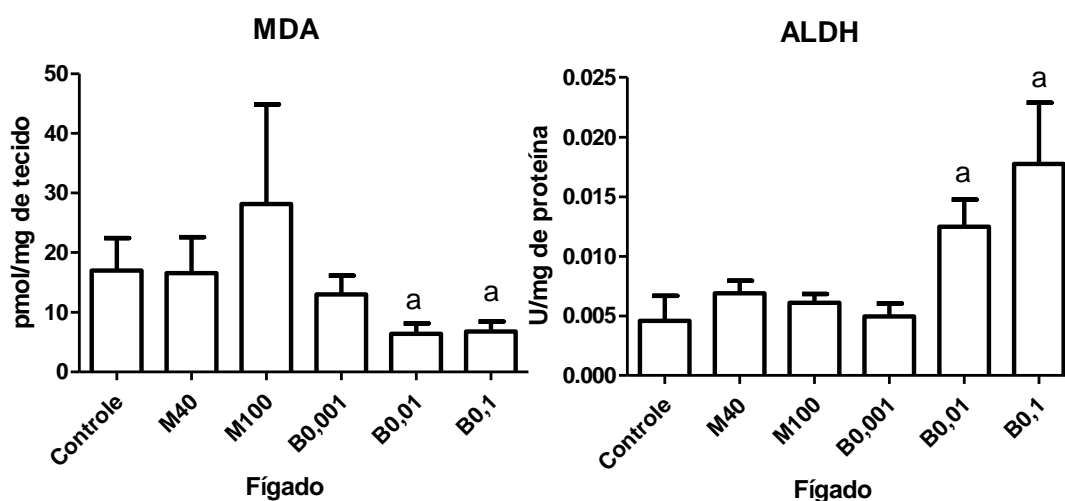


Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a Valores estatisticamente diferentes (p<0,05) em relação ao grupo controle. Para G6PDH, GPx e GSH-total foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de

Dunn's, para CAT e GST foi utilizado ANOVA one-way seguida por Fisher LSD, para FOX foi utilizado Kruskal-Wallis como teste estatístico.

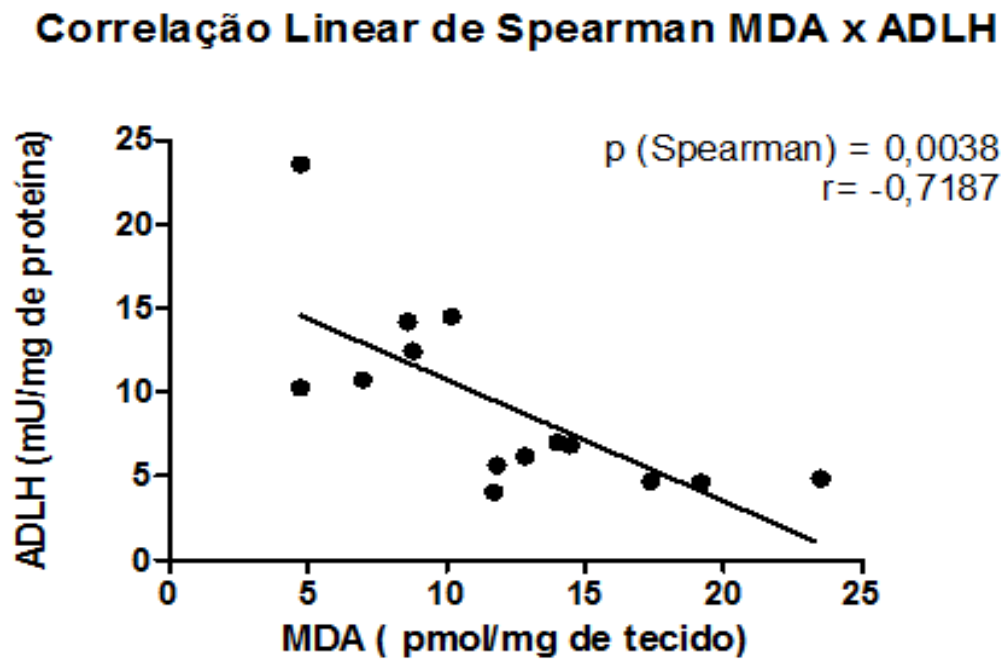
De fato, de acordo com a figura 19, no fígado a exposição ao diesel B5 levou a uma diminuição da atividade da CAT e da G6PDH, enquanto que a GPx não se alterou, o que compromete a hipótese de proteção antioxidante tendo como consequência a diminuição dos níveis de MDA. Por outro lado na figura 20, podemos observar que a atividade da ALDH mostrou-se significativamente aumentada nesse grupo no fígado, o que poderia explicar a diminuição dos níveis de MDA, corroborando com uma das principais hipóteses propostas nesse estudo. Observando a ausência de peróxidos lipídicos (FOX) na figura 19, primeiro produto formado após o dano lipídico, podemos inferir que não houve peroxidação lipídica e que as maiores concentrações de B5 podem ter ativado a ALDH que consumiu o MDA como substrato, fazendo com que a quantidade deste aldeído diminuiu-se significativamente.

Figura 20: Gráfico mostrando quantidade de MDA e atividade da ALDH em amostras de fígado de *Astyanax altiparae*, expostos a mistura dos metais Cd e Cu nas concentrações de 40 µg/L (M40) e 100 µg/L (M100) e B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1).



Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a Valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's como teste estatístico.

Figura 21: Correlação de Spearman entre MDA e ALDH em para amostras de fígado de *Astyanax altiparanae* após 5 dias de exposição a B5 nas concentrações de 0,001 mL/L (B0,001), 0,01 mL/L (B0,01) e 0,1 mL/L (B0,1).



De fato Chandran e Das (2012) mostraram atividade da ALDH em 5 leveduras expostas a óleo diesel após 48 horas de incubação enquanto que as leveduras incubadas em extrato sem o contaminante não apresentaram atividade para esta enzima. Outros trabalhos, relacionados com a degradação do óleo diesel, encontraram alta atividade de ALDH e inferem que os metabolitos do diesel são degradados via álcool/aldeído desidrogenase em ácidos decanóicos que posteriormente entram na via da ϵ -oxidação (SHUKOR, et al., 2013, LACZI., 2015).

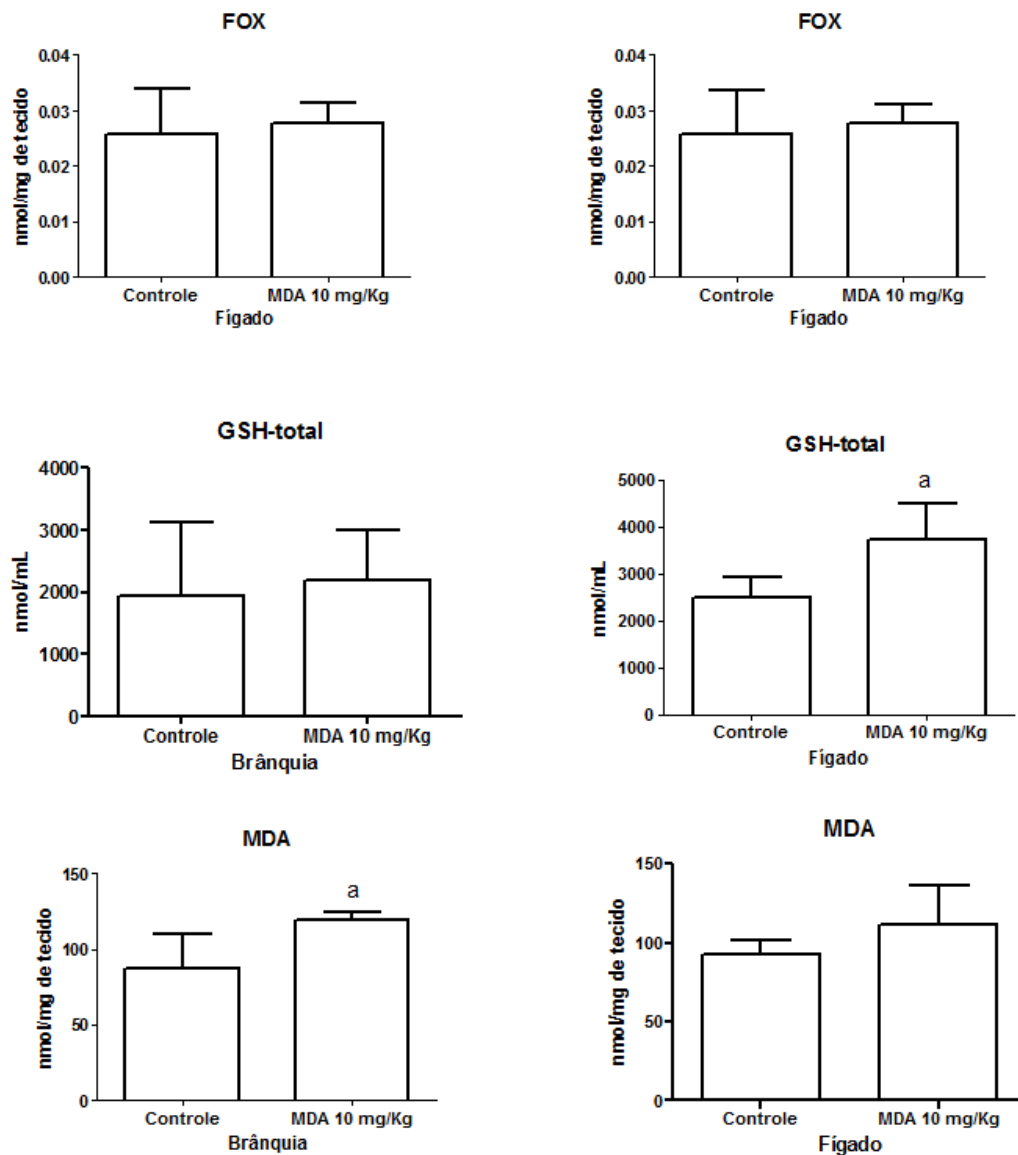
A correlação entre MDA e ALDH fica clara quando observamos a figura 21, que traz uma significativa correlação negativa entre o MDA e a ALDH, confirmando que aumento da atividade da ALDH tende a diminuir a quantidade de MDA no meio celular. Entendemos que há uma possível correlação entre os resultados do nosso trabalho, nas amostras de fígado do lambari expostos a maiores concentrações de B5 mostrados na figura 20 e estes trabalhos com diesel, de que não foi a PL e por consequência o MDA que provocaram o aumento de ALDH e sim a ativação da ALDH pelo diesel que diminuíram a quantidade de MDA que provavelmente estava em quantidades basais. Assim, o B5 estimulou a ALDH promovendo um possível efeito protetor o MDA. Também há um trabalho, do nosso grupo, com exposição do lambari *Astyanax sp.* ao diuron e seus metabolitos (DCA, DCPMU e DCPU) que após 7 dias de exposição mostrou uma diminuição na quantidade de MDA (SANCHES, 2014), assim como, Silva (2012) mostrou diminuição de MDA em tilápias do Nilo após 2 dias de exposição a concentração de 0,05 mg/L de um sal de Cd. Visto que a diminuição do aldeído não ocorre apenas em animais expostos ao B5, não podemos atribuir somente ao biodiesel a ativação da ALDH e diminuição da MDA. Muitos são os caminhos de metabolização do MDA.

Em nosso trabalho as figuras 19 e 17 mostram que o B5 foi capaz de induzir a atividade da GST nas concentrações de 0,001 e 0,1 mL/L em amostras de fígado e brânquia respectivamente, promovendo aumento da excreção de hidrocarbonetos presentes no diesel, dado o papel desta enzima em reações de fase II da biotransformação. Esse aumento foi subsidiado pelo aumento da GSH total que aumentou no fígado em todas as concentrações de B5 (Figura 19) e na brânquia nas duas maiores concentrações de B5 (Figura 18). Outros estudos mostraram que derivados de petróleo provocam aumento da atividade da GST como visto em fígado de *Catfish*

exposto a 0,1 mL/L de B5 (NOGUEIRA, et al., 2013), em amostras de fígado de *Oreochromis nolticus* expostos a diesel e B100 e amostras de brânquia e fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a fração solúvel do biodiesel (CAVALCANTE, 2012).

A GSH (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) é um tripeptídeo eficiente na defesa celular que participa da detoxificação por se um composto nucleófilo redutor que reage com espécies eletrofilicas e oxidantes (POMPELLA 2003), podendo agir de duas maneiras distintas; doando elétrons para moléculas receptores como a GPx e formando glutathiona oxidada ou sendo conjugada a xenobióticos nas reações de fase II pela GST (HELLOU; ROSS; MOON, 2012). Assim, os níveis de GSH total em amostras de fígado aumentaram em todas as concentrações de B5 utilizadas, como mostrado na figura 19, no experimento.

Figura 22: Gráfico dos níveis de peróxidos lipídicos (FOX) e quantidade de MDA e níveis de GSH total : Gráfico da quantidade de GSH- total em amostras de brânquia e fígado de lambari *Astyanax altipanae* injetados com solução salina (controle) e solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado) após 5 dias de exposição.

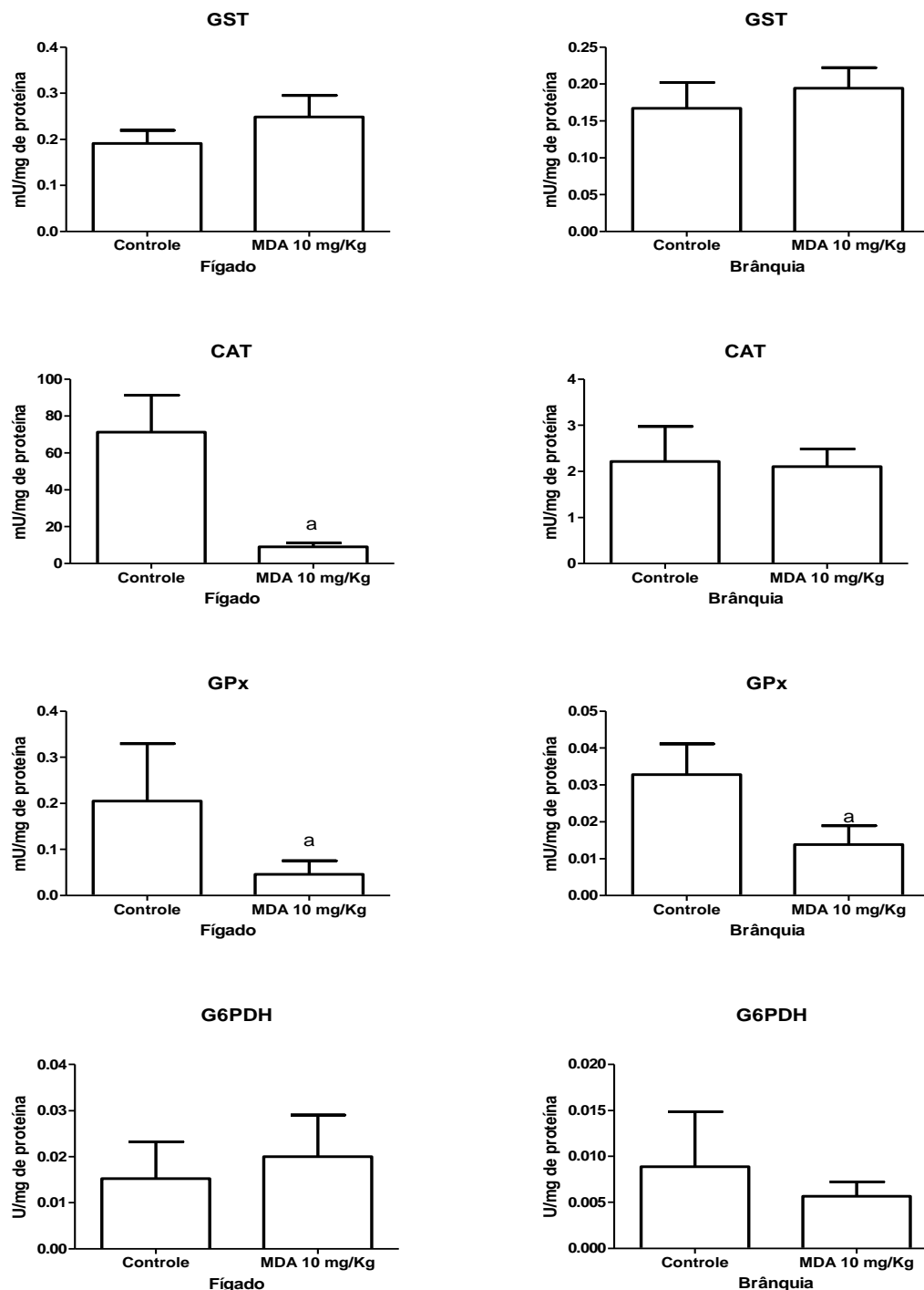


Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a Valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Para MDA e FOX no fígado e na brânquia foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's quando teve diferença significativa. Para GSH-total ANOVA one-way seguida por Fisher LSD quanto teve diferença significativa.

O experimento de 5 dias com injeção intraperitoneal na dose de 100 mg/Kg de MDA, mostrou o potencial de toxicidade deste aldeído, visto que os peixes que receberam esta dose morreram antes do final do experimento.

Os dados apresentados na figura 23 com dados do experimento de exposição dos peixes ao MDA por injeção intraperitoneal com duração de 5 dias, mostram que o aldeído não foi capaz de induzir a atividade de enzimas antioxidantes, observando ambas amostras de tecido. Estes dados são coerentes com o esperado, evidenciando que o papel protetor dos antioxidantes seria evitar o dano oxidativo, pela eliminação das ERO. No entanto, uma vez formada a lesão, ela em si não tem qualquer papel na indução dos antioxidantes.

Figura 23: Gráficos das atividades de enzimáticas da GST, CAT, GPx e G6PDH em amostras de brânquia e fígado de lambari *Astyanax altipanae* injetados com solução salina (controle) e solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado) após 5 dias de exposição.



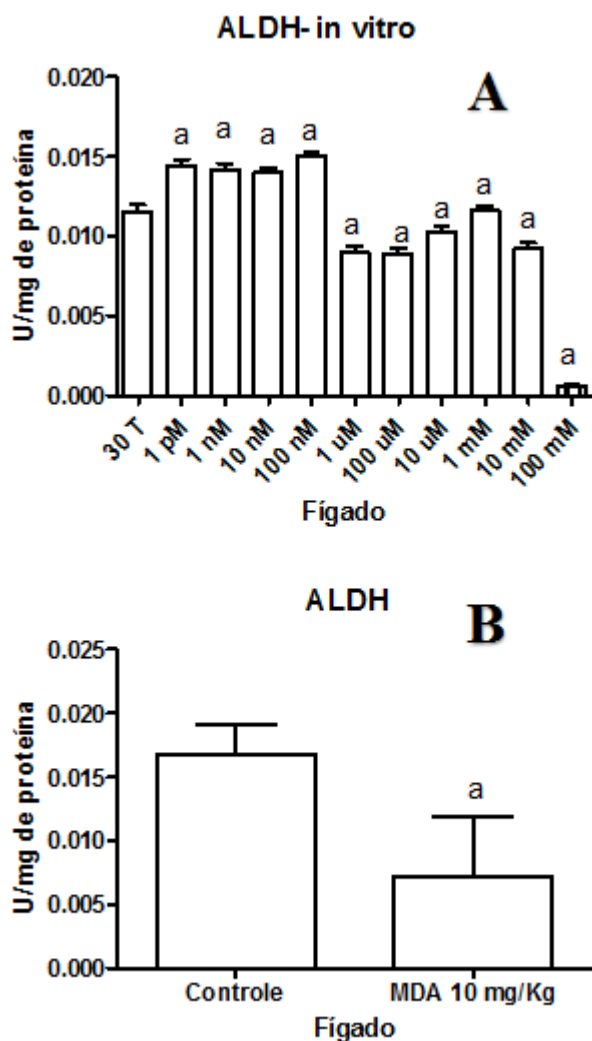
Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a Valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Para CAT (fígado) foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's quando teve diferença significativa. Para GST (brânquia e fígado), GPx (brânquia e fígado), G6PDH (brânquia e

fígado) e CAT (brânquia) foi utilizado ANOVA one-way seguida por Fisher LSD quanto teve diferença significativa.

O estudo realizado por Agadjanyan, Dmitriev e Dugin (2005) sugeriu que o MDA poderia servir como substrato da fosfoglicose isomerase (enzima que catalisa a isomeração de glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato e converte MDA em metilglioxal e este em lactato) interessante é que o sistema da glioxalases precisam de glutathione como cofator. Assim podemos inferir que o aumento da GSH, nas amostras de fígado dos peixes expostos a MDA após 5 dias, possa ser responsável por não ter alteração de MDA neste tecido (Figura 22).

É curioso notar que, diferentemente do efeito do B5 em aumentar a ALDH promovendo uma diminuição na quantidade de MDA (figura 20), quando injetados com o MDA, os animais tiveram a atividade da ALDH diminuída (figura 24). Não obstante, não houve alteração dos níveis de MDA no fígado (figura 22). Poderia-se supor que o MDA injetado intraperitonealmente não tenha chegado a esses tecidos, entretanto houve aumento do MDA nas brânquias (figura 22), sugerindo o contrário. Se de fato o MDA injetado atingiu o fígado, não foi capaz de induzir a ALDH.

Figura 14: Gráfico da atividade da ALDH em amostras de fígado de lambari *Astyanax altipanae*.



Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a indica diferença estatística com relação ao grupo controle $p < 0,05$. **A** Experimento in vitro com amostras de fígado incubados com MDA (foi utilizado ANOVA one-way seguida por Fisher LSD para teste estatístico). **B** no experimento de injeção intraperitoneal de solução fisiológica (grupo controle) e grupo injetado com uma dose de 10 mg/kg de MDA (foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para teste estatístico).

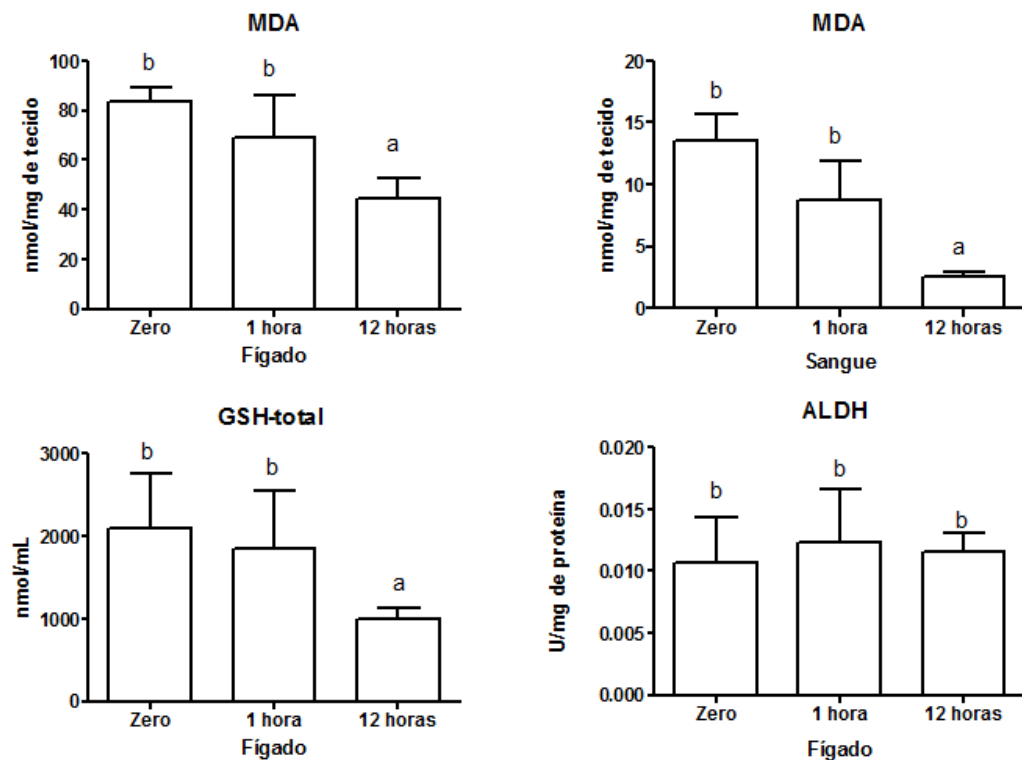
É possível observar na figura 24 que o experimento in vitro reforçou o que o MDA tem a capacidade de inibir a atividade da ALDH em concentrações superiores a 1 uM, fortalecendo a hipótese de alguns autores que sugerem que o excesso de MDA possa inibir a ADLH mitocondrial (HJELLE; GRUBBS; PETERSEN, 1982). Assim, é possível que o excesso de MDA injetado tenha causado um efeito negativo na enzima,

levando à diminuição de sua atividade. Hjelle e Petersen (1982) mostraram que a ADLH citosólica e mitocondrial foi capaz de metabolizar o MDA em um experimento *in vitro* em fígado de rato, mas que a velocidade de desaparecimento do MDA foi maior na fração citosólica quando comparada com a microssomal e mitocondrial, e só foi eficaz de metabolizar o MDA em concentrações baixas deste composto, indicando que ela atua na manutenção de aldeídos no corpo em concentrações fisiológicas.

Ainda, na figura 24, mesmo observado em nosso experimento *in vitro*, que as amostras de fígado incubadas com MDA em pequenas concentrações tiveram aumento da atividade da ALDH, com base nos resultados de nossos experimentos o MDA não foi capaz de induzir a atividade da ALDH, visto que ela teve aumento apenas no experimento com B5 (Figura 20), com isso, podemos inferir que ela não é a principal via de metabolização do MDA, entretanto uma vez ativada ela diminui os níveis de MDA no meio celular.

Por outro lado, é relevante notar que apesar da inibição da ADLH, não houve aumento nos níveis de MDA no fígado (Figura 22). Nossa hipótese é de que haja algum sistema eficiente de excreção de aldeídos nos tecidos dos peixes, que os encaminhem para as brânquias, de modo a que sejam diretamente eliminados na água. O aumento do MDA na brânquia (Figura 22), apenas, pode ser um indício de que isso ocorra de fato, no entanto, mais estudos são ainda necessários para corroborar essa hipótese.

Figura 25: Gráfico da quantidade de MDA em amostras de fígado e sangue, níveis de GSH total e atividade da ALDH em fígado em amostras de lambari *Astyanax altipanae* injetados com solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado), experimento com coleta de grupo no tempo zero, uma hora e 12 horas após a exposição.



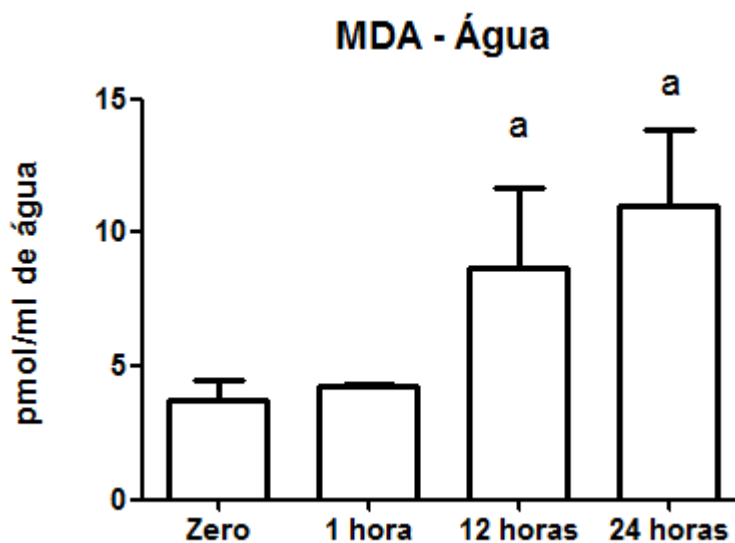
Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a indica diferença estatística com relação ao grupo controle $p < 0,05$. Para MDA (fígado) e ALDH foi utilizado ANOVA one-way seguida por Fisher LSD para teste estatístico. Para MDA (sangue) e GSH-total foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para teste estatístico.

O experimento de 12 horas com injeção intraperitoneal de MDA foi realizado para observarmos as respostas frente a exposição ao MDA em um tempo menor do que o experimento anterior de 5 dias, visto que neste experimento o MDA só tenha aumentado na brânquia após este experimento. É sabido que o MDA é extremamente reativo e uma vez formado pouco tempo permanece em sua forma livre. Ele pode ser metabolizado, reagir com as proteínas ou DNA formando adutos que resultam em danos moleculares, ser metabolizado pela aldeído desidrogenase e convertido a acetato e posteriormente a CO_2 e H_2O_2 , pode sofrer ação da fosfoglucose isomerase responsável por metabolizar o MDA citoplasmático a metilgioxal e D-Lactato por enzimas do

sistema da glioxalases usando GSH como cofator ou ainda, última porção ainda pode ser excretada na urina na forma de eminais de lisina e serina (AYALA; MUNOZ; ARGUELLES, 2014). Neste experimento, a figura 25 mostra que o MDA reduziu significativamente em sangue e fígado após 12 horas de exposição quando comparados com o grupo zero (grupo coletado imediatamente após receber a dose de MDA). No fígado, não foi observada alteração da atividade da ALDH (figura 25), essa diminuição do MDA pode ser explicada por outras rotas metabólicas que eliminam este aldeído, como sua excreção.

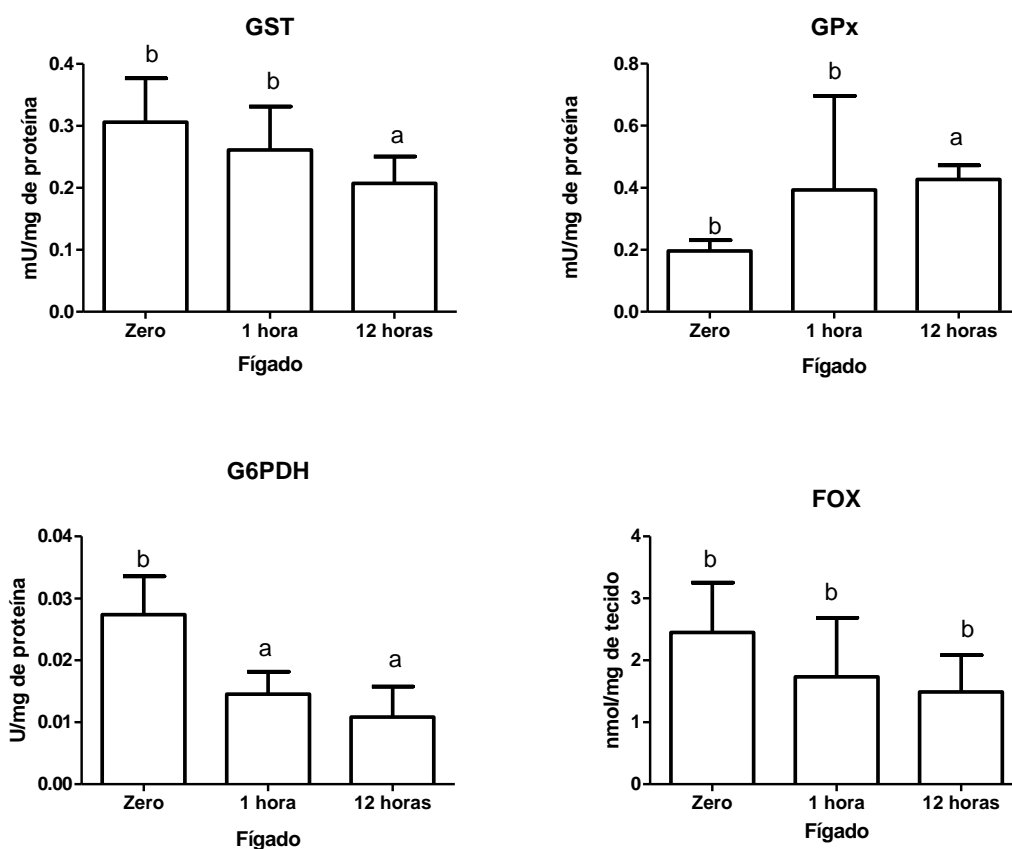
A figura 26 traz os dados obtidos de MDA nas águas coletadas nos tempos (zero, 1, 12 e 24 horas) em peixes que receberam doses de MDA, como se pode observar, há um aumento significativo de MDA na água com o decorrer do tempo experimental, assim esses dados confirmam uma das hipóteses levantada pelo grupo de que, a diminuição de MDA pode estar relacionada com sua excreção.

Figura 26: Gráfico referente a MDA em água nos tempos de zero, 1, 12 e 24 horas em peixes *Astyanax altiparanae* que receberam dose de 10 mg/Kg de MDA.



Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a indica diferença estatística com relação ao grupo controle $p < 0,05$) foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para teste estatístico.

Figura 27: Gráfico da atividade da GST, GPx e G6PDH e quantidade de peróxidos lipídicos (FOX) em amostras de fígado de lambari *Astyanax altipanae* injetados com solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado), experimento com coleta de grupo no tempo zero, uma hora e 12 horas após a exposição.



Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a indica diferença estatística com relação ao grupo controle $p < 0,05$). Estatística: Para GST e FOX foi utilizado ANOVA one-way seguida por Fisher LSD para teste estatístico. Para GPx e G6PDH foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's.

Ainda neste experimento, a figura 27 mostra que houve um aumento da atividade no fígado da GPx, responsável por oxidar a glutathione, de modo que observamos uma diminuição da GSH total (Figura 25) e uma diminuição da atividade

da GST (Figura 27) que utiliza esse tripeptídeo. A GSH pode ter sido utilizada no sistema da glioxalases que utilizam glutathione como cofator (AGADJANYAN; DMITRIEV; DUGION, 2005) e ainda utilizada para ceder os elétrons para a GPx (NORDBERG; ARNER, 2001) acarretando em sua diminuição. A GST também teve sua atividade diminuída, o que é esperado, uma vez que falta GSH no meio celular.

LONG e colaboradores (2009), observaram que o MDA sendo um produto capaz de oxidar amino ácidos, carboidratos e DNA pode gerar ERO causar dano oxidativo, ele foi capaz de inibir a atividade da SOD e diminuir níveis de GSH reduzida. A porcentagem de ERO aumentou 200 vezes e os níveis de GSH diminuíram nas maiores concentrações de MDA, este estudo foi realizado em mitocôndria de cérebro de rato. Assim como em nosso experimento de 12 horas (figura 25) uma diminuição na quantidade de GSH em fígado. Long, ainda sugere que essa diminuição de GSH esteja relacionada com modificações em grupos nucleofílicos de proteínas provocada pela reação com MDA. Fortalecendo a hipótese há uma relação entre os níveis de GSH e a quantidade de MDA no tecido.

Figura 28: Tabela das atividades enzimáticas da GST, GPx, G6PDH e CAT em amostras de fígado e brânquia de *Astyanax altiparanae* no experimento in vitro, incubados com MDA.

Atividades enzimáticas em amostras de fígado e brânquia de *Astyanax altiparanae* em exposição in vitro com malondialdeído por 5 minutos

Tecido	Tratamento	GST ^b	GPx ^b	G6PDH ^a	CAT ^a
Brânquia	controle	0.134 ± 0.008	0.094 ± 0.014	0.019 ± 0.004	8.745 ± 0.414
	100 uM	0.136 ± 0.015	0.077 ± 0.012	0.008 ± 0.003	7.931 ± 0.776
	1 mM	0.130 ± 0.009	0.086 ± 0.022	0.013 ± 0.006	8.154 ± 0.802
	10 mM	0.125 ± 0.020	0.097 ± 0.011	0.015 ± 0.006	7.813 ± 0.288
	100 mM	0.073 ± 0.019	0.091 ± 0.008	0.024 ± 0.013	8.713 ± 1.159
Fígado	controle	0.163 ± 0.064	0.290 ± 0.039	0.023 ± 0.004	16.164 ± 1.001
	100 uM	0.291 ± 0.016*	0.251 ± 0.142	0.018 ± 0.005	14.168 ± 0.444*
	1 mM	0.298 ± 0.008*	0.325 ± 0.169	0.018 ± 0.007	13.196 ± 1.403*
	10 mM	0.202 ± 0.044	0.272 ± 0.102	0.020 ± 0.006	13.459 ± 1.700*
	100 mM	0.071 ± 0.035	0.296 ± 0.110	0.025 ± 0.009	13.078 ± 1.073*

Nota: Dados expressos em média ± desvio padrão.

^a Atividade expressa em U mg⁻¹ proteína

^b Atividade expressa em mU mg⁻¹ proteína

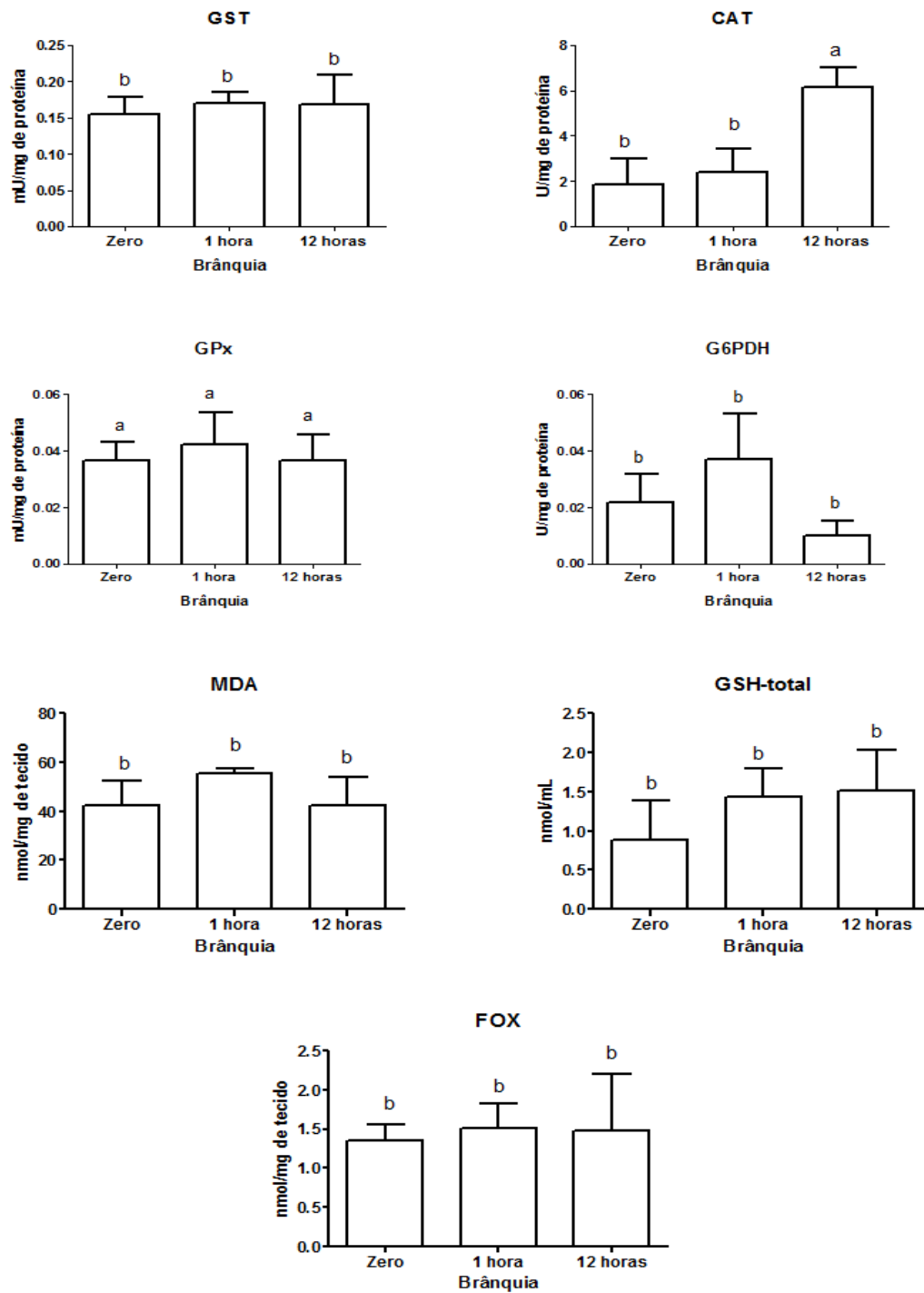
* Diferença significativa em relação ao grupo controle

Para CAT (fígado), GST (brânquia), G6PDH (brânquia e fígado) foi utilizado ANOVA one-way seguida por Fisher LSD quando teve diferença estatística.

Para CAT (fígado), GST (brânquia) e GPx (fígado e brânquia) foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. quando teve diferença estatística.

Interessante notar que a GPx teve sua atividade diminuída após 5 dias de exposição ao MDA (Figura 23) enquanto que sua atividade foi aumentada após 12 horas de exposição (Figura 27). Visto que no experimento in vitro não houve variação desta antioxidante em qualquer das concentrações utilizadas de MDA durante a incubação assim como observado também para G6PDH (Figura 28). Esta última deve sua atividade diminuída após exposição de 12 horas (Figura 27). Com isso podemos inferir que o MDA pode estar promovendo um aumento das ERO que por sua vez está provocando alterações nas atividades destas enzimas. A GST ainda que após 12 horas mostrou-se diminuída (Figura 27), in vitro aumentou sua atividade nas duas maiores concentrações do aldeído (Figura 28).

Figura 29: Gráfico da atividade da GST, GPx, CAT e G6PDH, quantidade de peróxidos lipídicos (FOX) e MDA em amostras de brânquia de lambari *Astyanax altipanae* injetados com solução de MDA 10 mg/kg de peixe (tratado), experimento com coleta de grupo no tempo zero, uma hora e 12 horas após a exposição



Nota: Dados expressos em média e desvio padrão. ^a indica diferença estatística com relação ao grupo controle $p < 0,05$). Para GST e G6PDH foi utilizado ANOVA one-way para teste estatístico. Para

CAT, GPx, MDA, GSH e Fox foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de Dunn's quando apresentou diferença significativa.

A figura 29 traz a resposta dos parâmetros avaliados no experimento de 12 horas, como é possível notar, ela não apresentou alterações significativas, exceto o aumento da atividade da CAT. Isso pode ter ocorrido devido ao pequeno tempo de experimento, a dose injetada intraperitonealmente pode ter atingido o fígado primeiro, uma vez que ele é o principal órgão de detoxificação, eliminando esse MDA de outras formas visto que com o passar das horas houve uma diminuição do aldeído neste órgão assim como no sangue.

Conclusões

5. Conclusões

Nossos resultados, levando em consideração o lambari *Astyanax altiparanae*, as concentrações utilizadas dos metais de 40 µg/L e 100 µg/L para cádmio e cobre, as concentrações de 0,001 mL/L, 0,01 mL/L e 0,1mL/L de B5 e a dose de MDA 10 mg/kg, mostram que as enzimas antioxidantes não são as responsáveis pela diminuição da quantidade de MDA, visto que nos grupos onde ocorreram tal diminuição, elas não se alteraram significativamente de tal forma que pudéssemos afirmar tal relação.

Os testes *in vitro* mostram que o MDA inibe a atividade da catalase, e que outras enzimas estudadas (GPx e G6PDH,) não apresentaram qualquer modificação com o aumento da concentração de MDA. Apenas a GST mostrou-se induzida em com concentrações baixas do aldeído, sugerindo que mesmo o MDA sendo uma molécula pequena, em baixas concentrações, poderia estar sendo metabolizado por esta enzima.

A diminuição de MDA no experimento com B5 está relacionada com o aumento da ALDH, podemos concluir que o B5 induziu a atividade da ALDH e esta diminuiu o MDA, que estava em níveis basais, visto que não houve PL nestes grupos. Os experimentos com injeção intraperitoneal mostraram que o MDA por si só não é capaz de ativar a atividade desta enzima, mais uma vez ativada ela pode diminuir este aldeído no meio celular fazendo com que ele seja expelido na respiração celular na forma de CO₂.

Assim como em trabalhos anteriores, vimos no experimento de 5 dias e confirmamos com o experimento *in vitro* que o MDA foi capaz de inibir a atividade da ALDH em concentrações mais elevadas.

A brânquia não possui atividade da ALDH e isso faz com que ela tenha outros meios de metabolizar o MDA formado após a PL, estando ela em contato direto com meio externo, acreditamos que ela seja capaz de eliminar o MDA excedente produzido na PL, o experimento com B5 confirmou que houve PL em todos esses grupos, entretanto somente no grupo de maior concentração vimos aumento de MDA. Esse MDA foi liberado na água, confirmamos isso, por meio da análises de MDA na água.

A excreção de MDA é uma importante rota de seu metabolismo, o trabalho mostrou que o peixe foi capaz de excretar esse aldeído tóxico para o meio externo. Assim, o próximo passo é saber em qual forma este MDA excretado no meio, para isso mais estudos serão necessários.

Referências

AGADJANYAN, Z. S.; DMITRIEV, L. F.; DUGIN, S. F. A new role of phosphoglucose isomerase. Involvement of the glycolytic enzyme in aldehyde metabolism. *Biochemistry (Moscow)*, v. 70, n. 11, p. 1251-1255, 2005.

AKERBOOM, Theodorus PM; SIES, Helmut. [48] Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in enzymology*, v. 77, p. 373-382, 1981.

AKPAKPAN. E. I. Biomarkers of Oxidative Stress and Histopathological Studies in Fish from Ibaka and Ifiayong Rivers, Akwa Ibom State, Nigeria. *World Applied Sciences Journal*, v. 32, n. 7, p. 1209-1218, 2014.

ALMEIDA, E. A. *et al.* DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 135, n. 3, p. 295–303, 2003.

ALMEIDA, E. A. *et al.* Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 318, p. 21–30, 2005.

ALMEIDA, E. A. *et al.* Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, n. 5-6, p. 386–92, 2004.

AMEUR, Walid Ben *et al.* Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*, v. 135, p. 67-74, 2015.

ANTONIO, Denise Sguarizi; MICHELUTTI, Kamylla Balbuena; MENDONÇA, Angélica. PEIXES E A BIOACUMULAÇÃO DE METAIS PESADOS, 2015

ARMSTRONG, B. M. *et al.* Reproductive effects in fathead minnows (*Pimphales promelas*) following a 21 d exposure to 17 α -ethinylestradiol. *Chemosphere*, v.144, p. 366-373, 2015.

ARUKWE, Augustine et al. Biotransformation and oxidative stress responses in captive Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) exposed to organic contaminants from the natural environment in South Africa. *PLoS one*, v. 10, n. 6, p. e0130002, 2015.

AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, 2014.

BARREIROS, A. L.B.S. et al., Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, *Química Nova*, v. 29, 2006.

BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune & Stratton, 1975.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–54, 1976.

CAVALCANTE, Dalita Gomes Silva Morais. Biomarcadores genéticos e bioquímicos para avaliar os efeitos do biodiesel, por meio de bioensaios in vivo e in vitro. 2012

CHANDRAN, Preethy; DAS, Nilanjana. Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environmental technology*, v. 33, n. 6, p. 645-652, 2012.

DE PAIVA MAGALHAES, Danielly; FERRAO-FILHO, Aloysio. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 3, 2008.

DJURIC, A. et al. Oxidative Stress, Bioelements and Androgen Status in Testes of Rats Subacutely Exposed to Cadmium. *Food and chemical Toxicology*, 2015.

DOMINGUES, Manoela de Souza. Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu. 2006.

DRAPER, H. H.; MCGIRR, L. G.; HADLEY, M. The metabolism of malondialdehyde. *Lipids*, v. 21, n. 4, p. 305-307, 1986.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M.; Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Oxygen Radicals in *Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*. v. 186, p. 421-431, 1990.

ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehyde lipidic-peroxidation products- malonaldehyde and 4-hidroxy-nonenal. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 407- 421, 1990.

FAROMBI, E.O., ADELOWO, O.A., AJIMOKO, Y.R. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Int J Environ Res Public Health*.p. 158-165, 2007.

FELÍCIO, A. A. et al. Biochemical responses, morphometric changes, genotoxic effects and CYP1A expression in the armored catfish *Pterygoplichthys anisitsi* after 15 days of exposure to mineral diesel and biodiesel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 115, p. 26-32, 2015.

FRENZILLI, G.; NIGRO M.; LYONS B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/reviews in Mutation Research*, v. 681, n. 1, p. 80-92, 2015.

GEDA, F. et al. β -Alanine does not act through branched-chain amino acid catabolism in carp, a species with low muscular carnosine storage. *Fish physiology and biochemistry*, v. 41, n. 1, p. 281-287, 2015.

GÉRET, F. et al. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources*, v. 15, p. 61-66, 2002.

GESTEL, C. A. M.; BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, v. 5, n. 4, p. 217-225, 1996.

GIRON-CALLE, J. et al. Bound Malondialdehyde in Foods: Bioavailability of the N-2-Propenals of Lysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6194-6198, 2002.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochemical Journal*, v. 55, n. 3, p. 400, 1953.

HASANEIN, Parisa; KAZEMIAN-MAHTAJ, Azam; KHODADADI, Iraj. Bioactive peptide carnosin protects against lead acetate-induced hepatotoxicity by abrogation of oxidative stress in rats. *Pharmaceutical biology*, p. 1-7, 2016.

HEFNAWY, Abd Elghany; EL-KHAIAT, Heba. Copper and animal health (Importance, maternal fetal, immunity and DNA relationship, deficiency and toxicity). *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, v. 9, n. 5, p. 195-211, 2015.

HELLOU, Jocelyne; ROSS, Neil W.; MOON, Thomas W. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 6, p. 2007-2023, 2012.

HJELLE, J. J., PETERSEN, D. R. Metabolism of malondialdehyde by rat liver aldehyde dehydrogenase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 70, n. 1, p 57-66, 1983.

HJELLE, Jerry J.; GRUBBS, John H.; PETERSEN, Dennis R. Inhibition of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by malondialdehyde. *Toxicology letters*, v. 14, n. 1, p. 35-43, 1982.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 9, n.6, p. 515-540, 1990.

JIANG, Z.Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLFF, S.P. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe²⁺ in the Presence of Xylenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric *Method*. *Lipid*, v. 26, p. 853-856, 1991.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem*, v. 251, n. 20, p. 6183-8, 1976.

KHALID, M. U. et al. Heavy metals (chromium, copper and cadmium) induced oxidative stress in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) during acute and chronic toxicity experiment. *International Journal of Biosciences (IJB)*, v. 6, n. 11, p. 64-72, 2015.

KIM, S. et al. Urinary phthalate metabolites among elementary school children of Korea: Sources, risks, and their association with oxidative stress marker. *Science of the Total Environment*, v. 472, p. 49-55, 2014.

KOWALTOWSKI, Alicia Juliana. **Participação da mitocôndria na regulação da viabilidade celular**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LABROT, F. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, p. 21-28, 1996.

LACZI, Krisztián et al. Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, n. 22, p. 9745-9759, 2015.

LASSEN, Natalie et al. Molecular cloning, baculovirus expression, and tissue distribution of the zebrafish aldehyde dehydrogenase 2. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 33, n. 5, p. 649-656, 2005.

LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. Peroxidação Lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas, *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, p. 293-301, 2001.

LOMBARD, P. E; PERI, S. I; GUERRERO, N.R.V. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, n. 7, p. 1704-1711, 2010.

LONG, Jiangan et al. Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. *Neurochemical research*, v. 34, n. 4, p. 786-794, 2009.

MARCHITTI, Satori A. et al. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 4, n. 6, p. 697-720, 2008.

MCGIRR, Larry G.; HADLEY, Mary; DRAPER, Harold H. Identification of N alpha-acetyl-epsilon-(2-propenal) lysine as a urinary metabolite of malondialdehyde. *Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 29, p. 15427-15431, 1985.

MEENA, B; et all., Induction of metallothionein with cadmium chloride in economically important freshwater fish-grass carp, ctenopharyngodon idella (Valenciennes, 1844) *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v 8, n 5, p. 131-136, 2015

MONERÓ, T.; RODRIGUES, A.C; ALMEIDA, E.A. Efeitos da associação de benzo(a)pireno e 17- β -estradiol em biomarcadores de biotransformação em tilápias *Oreochromis niloticus*. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v.6, n.2, p.32-61, 2013.

NELSON, J. S. Fishes of the world. 3 ed. *New York: John Wiley & Sons*, 1994.

NETO, J.M.F.A. et al. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: Overreaching Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 14, n. 6, 2008.

NISHIDA, Y. The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, v. 142, n. 4, p. 375-384, 2011.

NOGUEIRA, L. et al. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. *Chemosphere*, v.134, p. 210-216, 2015.

NOGUEIRA, Lílian et al. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere*, v. 85, n. 1, p. 97-105, 2011.

NOGUEIRA, Lílian et al. Biochemical responses in armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 311-319, 2013.

NORDBERG, J.; ARNER, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol and Med*, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

PALACE, Vincent P. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase antioxidant enzyme activities as indicators of lipid peroxidative stress in freshwater fish. 1992.

POMPELLA, Alfonso et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1499-1503, 2003.

PRABHU, K. S. et al., Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 424, n. 1, p. 72-80. 2004.

RAND, G.M. & PETROCELLI, S. R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington, p 665.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. Check List of Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: *Edipucrs*, 2003. 742 p.

RIBEIRO, Sonia Machado Rocha et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal*, v. 21, n. 3, 2006.

RIO, D. D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. v.15, n. 4, p. 316-328, 2005.

ROCHA, Julio Cesar; ROSA, André Henrique; CARDOSO, Arnaldo Alves. *Introdução à química ambiental*. Artmed, 2004.

ROMEO, Michele et al. Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. *Science of the Total Environment*, v. 232, n. 3, p. 169-175, 1999.

SÁEZ, M. I. et al. Effect of sublethal concentrations of waterborne copper on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant response in *Gambusia holbrooki*. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 36, n. 1, p. 125-134, 2013.

SANCHES, Ana Leticia Madeira. Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp.): testes de toxicidade, marcadores de estresse oxidativo, marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação. 2014. 79 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014

SCHULZ, U. H.; MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 61, n. 4, p. 615-622, 2001.

SHUKOR, Mohd Yunus. Characterization of diesel-degrading enzymes from *Acinetobacter* sp. strain DRY12. *BIOREMEDIATION SCIENCE AND TECHNOLOGY RESEARCH* (e-ISSN 2289-5892), v. 1, n. 1, p. 15-18, 2013.

SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett*, v. 103, n. 2, p. 287–90, 1979.

SILVA, Andressa G.; MARTINEZ, Cláudia BR. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 23, n. 2, p. 185-192, 2007.

SILVA, Daniele Caetano da. Variação em biomarcadores bioquímicos de contaminação em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de diferentes portes. 2012.

SILVA, Maria Amália da. Ensaios de toxicidade aguda e crônica com Cd, Cu e (Cd+ Cu) em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2013.

SIU, G.M.; DRAPER, H.H. Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids* 17:349-355; 1982.

SLEKAR, K.H.; KOSMAN, D.J.; CULOTTA, V.C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem*, v. 271, n. 46, p.28831-28836. 1996

STEPHENSON, E.; STURVE, J.; FORLIN, L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.v.133, p.435-442,2002.

SYDOW, Karsten et al. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, v. 113, n. 3, p. 482-489, 2004.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, n. 2, p. 178-189, 2006.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, v. 27, p.120–39, 2009.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VASILIOU, Vasilis; PAPPA, Aglaia; ESTEY, Tia. Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug metabolism reviews*, v. 36, n. 2, p. 279-299, 2004.

WANG, Yanhua et al. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 122, p. 81-85, 2015.

ZEID, E.H.A., KHALIL, A.S.A. Toxicological Consequences of Di-N-Butyl-Phthalate (DBP) on Health of Nile Tilapia Fingerlings. *American Journal of Animal and Veteriinary Sciences*, v. 9, n. 4, 2015.

ZHANG, J. F. et al. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 58, n. 1, p. 110–6, 2004.

Apêndice – Comissão de ética do uso de animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

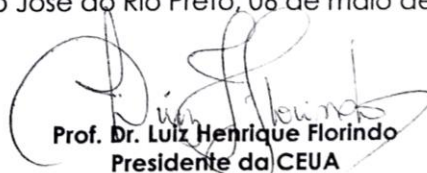
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Metabolismo do Malondialdeído em peixes: Implicações na avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de contaminação aquática**", protocolo nº. 103/2014 - CEUA, sob a responsabilidade do Professor Doutor Eduardo Alves de Almeida, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os Preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), do IBILCE/UNESP, em reunião de 06 de maio de 2015.

Vigência do Projeto	10/03/2014 a 10/03/2016
Espécie/linhagem	Peixe/ <i>Astyanax</i> sp.
Nº de animais	225
Peso/Idade	9 gramas/ adulto
Sexo	Não especificado
Origem	Lojas de iscas da cidade de São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto, 06 de maio de 2015.


Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
Presidente da CEUA

Recebido em 26/05/15
Ass. [Handwritten Signature]

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
B0,001	5% Biodiesel na concentração experimental de 0,001 mL/L
B0,01	5% Biodiesel na concentração experimental de 0,01 mL/L
B0,1	5% Biodiesel na concentração experimental de 0,1 mL/L
B5	Combustível com 5% de biodiesel e 95% de óleo diesel
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FOX	termo utilizado para o ensaio que mede peróxidos lipídicos
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona na forma reduzida
GST	Glutaciona S-transferase
HPLC	High performance liquid chromatography
LOOH	Peróxidos Lipídicos
M100	Mistura de Cd e Cu na concentração 100 mg/L
M40	Mistura de Cd e Cu na concentração 40 mg/L
MDA	Malondialdeído
Mn-SOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
NPL	N-propenal-lisina
PL	Peroxidação lipídica
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico