

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Maria Eleonora Feracin da Silva

**“IMPLICAÇÕES TOXICOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE  
XENOBIÓTICOS EM CURIMBATÁ (*PROCHILODUS SCROFA*,  
STEINDACHNER, 1881) UM PEIXE TROPICAL  
BRASILEIRO”.**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Maria Eleonora*  
*Feracin da Silva*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do Título  
de Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular na área de Bioquímica

Orientadora  
Profa Dra Nilce Correa Meirelles

Campinas  
2002

UNIVERSIDADE 88  
CHAMADA T/UNICAMP  
Si38i  
EX  
JMBD BCI 49478  
IOC 16.837/02  
DX  
FEÇO R\$ 11,00  
ATA  
CPD

CM00168740-7

IBID 242778

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Si38i** **Silva, Maria Eleonora Feracin da**  
Implicações toxicológicas e bioquímicas de xenobióticos em Curimbatá  
(*Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881) um peixe tropical brasileiro/  
Maria Eleonora Feracin da Silva. --  
Campinas, SP:[s.n.], 2002

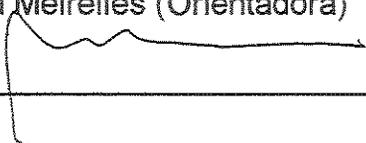
Orientadora: Nilce Correa Meirelles  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia

1. Biotransformação (metabolismo). 2. Xenobiotica - Toxicologia.  
3. Biomarcadores. 4. Peixe. I. Meirelles, Nilce Correa. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

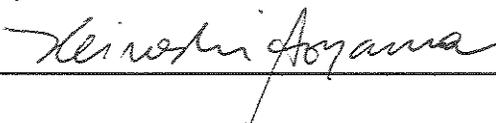
**Data da Defesa 20/02/2002**

**Banca Examinadora**

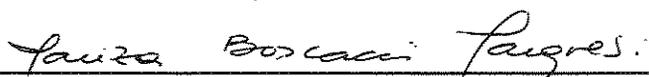
Profª. Dra. Nilce Correa Meirelles (Orientadora)

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

  
\_\_\_\_\_

Profª. Dra. Mariza Boscacci Marques

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Camillo Novello

\_\_\_\_\_

2025/196

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro aos trabalhos desenvolvidos nesta tese. Meu agradecimento a esta instituição inclui a esperança de que cada vez mais pesquisadores possam se beneficiar de seu apoio para continuarem a manter em alto nível a produção acadêmica.

Aos meus pais Antonino e Zélia pelos esforços que fizeram para eu chegar até aqui, pela confiança depositada durante tantos anos, por serem um exemplo de integridade e por me ensinarem os verdadeiros valores.

Ao meu “ermão” Luis Felipe (“Oi meu amor!”) pelos momentos alegres que passamos juntos em casa e por aceitar os meus “nãos” cada vez que me perguntava se eu ia para casa nos fins de semana.

À minha “ermã” Ana (Kérol) por saber conviver com meus ataques, minhas neuras. Pela cumplicidade nos momentos alegres e pelo sofrimento em conjunto nos “fóns” (e como nós levamos “fóns”, não!). Por saber lidar com as minhas oscilações de humor somadas ao caos doméstico (Kérol, sou obrigada a admitir que estamos ficando velhas porque estas coisas aconteceram durante nossas graduações e no mestrado...).

Ao Du (♥), pela confiança, cumplicidade e compreensão das ausências. Pela paciência em me escutar e por estar sempre ao meu lado me incentivando em todas as etapas deste e de outros projetos. Palavras não são suficientes para demonstrar o quanto você é importante para mim. TE AMO!!

À Dra Nilce Correa Meirelles, que nestes quase 5 anos de convivência se mostrou mais do que uma orientadora, mas uma amiga e uma grande referência profissional e pessoal.

Aos professores Dr. Hiroshi Aoyama, Dra. Eneida de Paula, Dra. Sônia Malheiros e Dra. Mariza Boscacci por todos os “sins”, mas principalmente pelos “nãos”. As críticas e sugestões dadas contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho e da minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Igor A. Degterev que, apesar da nossa convivência um tanto quanto tumultuada, foi o responsável por me mostrar as primeiras coisas sobre P450.

Ao CEPTA/IBAMA, em especial aos Coordenadores, Sr. Bernardino, ao Sr. Laérte, e à Rita pelo fornecimento dos peixes e disponibilidade dos laboratórios.

À Andréia e à Marina pelos quebra galhos mil durante todo este tempo aqui no Departamento de Bioquímica.

À todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à Maribel, Paulo Baldasso, Juliana Matoso e Daniel, que muito ajudaram para o desenvolvimento do meu trabalho e sempre atenderem aos meus pedidos com prontidão.

Ao Dr. Sérgio Marangoni e Dr. José Camilo Novello por possibilitarem o uso do Laboratório de Química de Proteínas durante parte deste trabalho.

Ao Zeca por me fazer acreditar que sempre há um pouco de proteína em um tubo de ensaio aparentemente vazio, por sua paciência com os meus géis

de 9 horas de corridas. Qualquer agradecimento a ele seria insuficiente e neste caso a expressão “obrigada por tudo” é válida, pois sem ele a purificação do P450 e o início do meu projeto de doutorado não teriam saído do papel.

Aos amigos Márcio, André, Bayki, Zeca (de novo), Graziela, Maristela e Telma pelos bate papos descontraídos nos corredores da Bioquímica.

À Dani Japinha e ao Eduardo, os eternos agregados do Biomembranas e habitantes do Ensino, pelos bate papos, ajudas e principalmente por mostrarem que a Bioquímica não é feita só de bancada e tubos de ensaios.

Aos membros da família Biomembranas que ainda insistem em permanecer no laboratório, com certeza a convivência com vocês tornaram o trabalho menos penoso e mais engraçado.

Ao Léo (“Quebra tudo Corinthians!”), meu companheiro favelado sou obrigada a admitir que deveria ter escutado mais seus conselhos. À Dani “Murango”, que chegou por último com seu “sutaquzinho arretado” e matando milhões de camundongos, pelas horas de conversa (lê-se fofocas) tanto no laboratório quanto no ônibus durante aqueles minutos intermináveis que separam a UNICAMP de nossas casas. À Lú, minha companheira em desorganização de mesa e ao Paulinho cuja mesa sempre tem tudo o que eu preciso, inclusive espaço, pelos momentos de descontração, fofocas e estresses. Ao Bispo, à Jú e à Hayda, por aquela força que só os alunos de iniciação científica sabem ter. Aos Amigos do Biomembranas que já passaram por aqui, em especial à Vanessa, Dani “Viu” Lodetti e Jack, vocês deixaram muitas saudades...

Às minhas grandes amigas e comparsas de graduação e do mestrado que sempre estiveram presentes na minha vida (mesmo que por e-mail). À Mariângela, minha primeira amiga de graduação e comparsa de muitas horas. À Tatiana minha companheira de estudos e sofrimentos e atual exemplo de que a gente pode dar uma guinada de 180° e ser bem sucedida. À Carla, pelas nossas conversas regadas a corneto de morango. À Renatinha pelas grandes conversas filosóficas e à Letícia, sempre a disposição para fazer tudo para te ajudar e por mostrar que nem sempre você precisa conhecer a pessoa por muitos anos para saber o que ela está pensando. É bom saber que nos próximos anos de doutorado vou poder contar com tudo isto de novo.

Enfim, à todos que direta e indiretamente contribuíram para que este projeto desse certo.

**Obrigado!**

*Maria Eleonora*

***“A mais profunda emoção que podemos experimentar é inspirada pelo senso de mistério. Essa é a emoção fundamental que inspira a verdadeira arte e a verdadeira ciência.”***  
**Albert Einstein**

***Dedico esta tese aos meus pais, à Ana, ao Fí e ao Du, por fazerem de mim o que sou...***

# ÍNDICE

<b>1 – Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 – Poluição ambiental e o conceito de biomarcadores	1
1.2 – Biotransformação	6
1.2.1 – Sistema microsossomal hepático P450	7
1.2.2 – Glutathione – S - Transferase	14
1.3 – A geração de radicais livres pelo sistema P450	16
1.4 – Defesas Antioxidantes	19
1.5 – Peroxidação lipídica em membranas microsossomais	21
1.6 – A biotransformação em peixes e seu uso como biomarcadores de poluição ambiental	23
1.7 – Ecologia de <i>Prochilodus scrofa</i> (Steindachner, 1881) (Pisces, Chariciforme, Prochilodontidae)	26
1.8 – Características dos xenobióticos estudados	28
1.8.1 – Trifluoperazina – (TFP)	29
1.8.2 – Surfactantes não-iônicos – Triton X-100 e Tween 80	30
<b>2 – Objetivos</b>	<b>34</b>
<b>3 – Material e Métodos</b>	<b>35</b>
3.1 – Material Biológico	35
3.2 – Preparação dos microsossomas	35
3.2.1 – Dosagem de proteínas	36
3.3 – Caracterização espectral dos citocromos b5, P420 e P450	36
3.4 – Metabolismo e incubação dos xenobóticos	39
3.5 – Caracterização eletroforética do sistema microsossomal hepático	40
3.5.1 – Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	40
3.5.2 – Eletroforese em condições nativas	40
3.5.3 – Coloração do gel – método Comassie Blue R250	41

3.6 – Purificação Parcial do citocromo P450 através de cromatografia líquida de fase reversa (via HPLC)	41
3.7 – Dosagem das enzimas de biotransformação	42
3.7.1 – Atividade da NADPH citocromo P450 redutase	42
3.7.2 – Atividade da Glutathiona – S – Transferase	43
3.8 – Detecção das isoformas do citocromo P450 e os efeitos causados pelos xenobióticos estudados em cada uma delas.	44
3.8.1 – Etoxiresorufin – O – Deetilase	45
3.8.2 – Pentoxiresorufin – O – Deetilase	46
3.9 – Dosagem das enzimas antioxidantes	46
3.9.1 – Superóxido dismutase - E.C. 1.15.1.1	47
3.9.2 - Catalase – E.C. 1.11.1.6	47
3.9.3 – Glutathiona Peroxidase – E.C. 1.11.1.9	48
3.10 – Análise dos níveis de peroxidação lipídica – TBARS	50
3.11 – Deslocamento do pico de Triptofano	50
3.12 – Interação entre os citocromos P450 e os xenobióticos	51
3.13 – Análises Estatísticas	52
<b>4 - Resultados</b>	<b>53</b>
4.1 – Caracterização dos componentes do sistema microsomal hepático (SMH) de <i>Prochilodus scrofa</i>	53
4.2 – Purificação do citocromo P450 de <i>Prochilodus scrofa</i>	58
4.3 – Biotransformação dos xenobióticos	63
4.3.1 – Citocromos b5, P420 e P450	63
4.3.2 – NADPH citocromo P450 redutase – NCR	88
4.3.3 – Glutathiona – S – Transferase	92
4.4 – Enzimas antioxidantes	95
4.4.1 – Superóxido Dismutase	96
4.4.2 – Catalase	101
4.4.3 – Glutathiona Peroxidase	105
4.5 – Peroxidação lipídica	109
4.6 – Detecção das isoformas do citocromo P450 e os efeitos	113

causados pelos xenobióticos estudados em cada uma delas.	
<b>4.7 – Análise dos resíduos de Triptofano (Trp)</b>	<b>118</b>
<b>4.8 – Alterações causadas pelos xenobióticos na carga total do SMH</b>	<b>122</b>
<b>5 – Conclusões</b>	<b>126</b>
<b>6 - Bibliografia</b>	<b>129</b>
<b>Apêndice I – Tabela de resumo dos dados</b>	<b>145</b>
<b>Apêndice II – Perspectivas futuras</b>	<b>146</b>
<b>Apêndice III – Comunicações em Congressos</b>	<b>147</b>
<b>Apêndice IV - Artigos Publicados e Submetidos</b>	<b>148</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Conceitos e aplicações dos principais tipos de biomarcadores.	<b>4</b>
<b>Tabela 2</b> – Propriedades físico-químicas dos Xenobióticos estudados.	<b>28</b>
<b>Tabela 3</b> – Gradiente utilizado no HPLC para eluição do material aplicado à coluna de $\mu$ -Bondapack C18.	<b>42</b>
<b>Tabela 4</b> – Concentração das proteínas de <i>Prochilodus scrofa</i> (Curimatá).	<b>54</b>
<b>Tabela 5</b> – Comparação do conteúdo microsomal em diferentes espécies de peixes e mamíferos.	<b>55</b>
<b>Tabela 6</b> – Concentração dos citocromo b5, P450 e P420 após a adição da droga.	<b>64</b>
<b>Tabela 7</b> – Concentração dos citocromo b5, P450 e P420 após 20 minutos de incubação.	<b>65</b>
<b>Tabela 8</b> – Efeito da adição do Triton X-100 nos citocromos b5, P450 e P420.	<b>73</b>
<b>Tabela 9</b> – Efeito do Triton X-100 nos citocromos b5, P450 e P420 após 20 minutos de incubação.	<b>74</b>
<b>Tabela 10</b> – Efeito da adição de Tween 80 nas concentrações dos citocromo b5, P450 e “P420”.	<b>79</b>
<b>Tabela 11</b> – Efeito do Tween 80 nas concentrações do citocromo b5, P450 e “P420” após 20 minutos de incubação.	<b>80</b>
<b>Tabela 12</b> – Efeito dos xenobióticos na atividade da NADPH citocromo P450 redutase	<b>89</b>
<b>Tabela 13</b> – Efeito dos xenobióticos na atividade da Glutathione – S – Transferase.	<b>92</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquema das reações catalisadas pelo citocromo P450.	<b>10</b>
<b>Figura 2</b> – Ciclo catalítico do citocromo P450.	<b>12</b>
<b>Figura 3</b> – Reações de geração e detoxificação das principais espécies reativas do oxigênio.	<b>18</b>
<b>Figura 4</b> – Esquema das reações de peroxidação lipídica em membranas microssomais.	<b>22</b>
<b>Figura 5</b> – <i>Prochilodus scrofa</i> (Steindachner, 1881).	<b>27</b>
<b>Figura 6</b> – Estrutura dos xenobióticos estudados.	<b>31</b>
<b>Figura 7</b> – Características espectrais dos dois principais componentes do SMH de <i>Prochilodus scrofa</i> .	<b>56</b>
<b>Figura 8</b> – SDS – Page da fração microssomal hepática de <i>Prochilodus scrofa</i> antes da purificação,	<b>59</b>
<b>Figura 9</b> – Purificação da forma hepática do citocromo P450 de <i>Prochilodus scrofa</i> .	<b>61</b>
<b>Figura 10</b> – Efeito da Trifluoperazine no conteúdo do citocromo b5.	<b>66</b>
<b>Figura 11</b> – Efeito da Trifluoperazine no conteúdo do citocromo P450.	<b>68</b>
<b>Figura 12</b> – Interação entre a TFP e os componentes do Sistema Microssomal Hepático.	<b>69</b>
<b>Figura 13</b> – Efeito da Trifluoperazine no conteúdo do citocromo “P420”.	<b>70</b>
<b>Figura 14</b> – Efeito do Triton X-100 no conteúdo do citocromo b5	<b>72</b>
<b>Figura 15</b> – Efeito do Triton X-100 no conteúdo do citocromo P450.	<b>75</b>
<b>Figura 16</b> – Interação dos componentes do Sistema Microssomal Hepático de <i>Prochilodus scrofa</i> com Triton X-100.	<b>76</b>
<b>Figura 17</b> – Efeito do Triton X-100 no conteúdo do citocromo “P420”	<b>77</b>
<b>Figura 18</b> – Efeito do Tween 80 no conteúdo do citocromo b5	<b>80</b>
<b>Figura 19</b> – Efeito do Tween 80 no conteúdo do citocromo P450	<b>81</b>
<b>Figura 20</b> – Interação do Tween 80 com os componentes do Sistema Microssomal Hepático de <i>Prochilodus scrofa</i> .	<b>82</b>
<b>Figura 21</b> – Efeito do Tween 80 no conteúdo do citocromo “P420”.	<b>84</b>
<b>Figura 22</b> – Efeito do tempo na atividade da NADPH citocromo P450 redutase.	<b>90</b>
<b>Figura 23</b> – Efeito do tempo na atividade da Glutathione – S – Transferase.	<b>94</b>
<b>Figura 24</b> – Efeito de xenobióticos na atividade da Superóxido Dismutase.	<b>100</b>
<b>Figura 25</b> – Efeito de xenobióticos na atividade da Catalase	<b>103</b>

<b>Figura 26</b> – Efeito de xenobióticos na atividade da Glutathione Peroxidase.	<b>108</b>
<b>Figura 27</b> – Efeito dos xenobióticos na peroxidação lipídica	<b>112</b>
<b>Figura 28</b> - Detecção das isoformas CYP1A e CYP2B por fluorescência.	<b>114</b>
<b>Figura 29</b> – Efeito do tempo na ativação da CYP1A	<b>116</b>
<b>Figura 30</b> – Efeito de xenobióticos no espectro de fluorescência do Triptofano.	<b>120</b>
<b>Figura 31</b> – Efeito da TFP na carga total da suspensão microsomal.	<b>123</b>
<b>Figura 32</b> – Efeito do Triton X-100 na carga total da suspensão microsomal.	<b>124</b>
<b>Figura 33</b> – Efeito do Tween 80 na carga total da suspensão microsomal	<b>125</b>

## LISTA DE ABREVIações

$\epsilon$  - Coeficiente de extinção molar

“P420” – hemeoproteínas do SMH com Absorbância máxima em 418-420nm

ACN - Acetonitrila

ANOVA – Análise de multivariância

b5 - citocromo b5

BSA – Soro Albumina Bovina

CAT – Catalase

CDNB – 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno

CEPTA – Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura

CETESB – Companhia Tecnológica de Saneamento Ambiental

CMC – Concentração Micelar Crítica

CYP1A1 – citocromo P450 subfamília 1A1

CYP2A – Citocromo P450 família 2A

CYP2B - citocromo P450 família 2B

CYP3A – Citocromo P450 família 3A

EROD - Etoxiresorufina –O – Deetilase

GPx – Glutathiona Peroxidase

GSH – Glutathiona

GST – Glutathiona –S –Transferase

HO $\cdot$  – radical hidroxil

HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão

IBAMA – Instituto Brasileiro de Apoio ao Meio Ambiente

LOO $\cdot$  – radical peroxilipídico

LOOH - radical lipídio hidroperóxido

LPLC – Cromatografia líquida de baixa precisão

NCR – NADPH citocromo P450 redutase

O $_2^{\cdot-}$  Radical Anion Superóxido

P420 – Citocromo P450 na forma solúvel

P450 – Citocromo P450

**PEG** – Polietilenoglicol  
**PROD** – Pentoxiresorufina – O – Deetilase  
**PSA** – Persulfato de amônio  
**r** – coeficiente de correlação  
**SDS** – dodecilsulfato de sódio  
**SMH** - Sistema microsomal hepático  
**SOD** - Superóxido Dismutase  
**SRNADPH** – Sistema Regenerador de NADPH  
**TBA** – Ácido Tiobarbitúrico  
**TBARS** – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico  
**TCA** – Ácido Tricloro acético  
**TFA** – Ácido Trifluoroacético  
**TFP** – Trifluoperazina  
**Trp** – Triptofano  
**UB** – Unidade Bergmeyer  
**UGT** – UDP – Glucosil – Transferase

## **RESUMO**

Citocromos P450 formam uma superfamília de proteínas que metabolizam um grande número de substratos endógenos e xenobióticos. O metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 é uma importante área da farmacologia molecular e da toxicologia que vem sendo usada nas últimas décadas como ferramenta de biomonitoramento contra os danos causados por poluentes. O objetivo deste trabalho foi estudar o sistema P450 (fase I da biotransformação), Glutathione-S-Transferase (GST – fase II da biotransformação) e enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) no fígado de Curimatá, um peixe brasileiro, frente à ação de três xenobióticos (Trifluoperazine, Triton X-100 e Tween 80), viabilizando o uso do citocromo P450 como biomarcador de poluição ambiental. A caracterização espectral do sistema mostrou que Curimatás têm um componente extra no sistema microsomal que se caracteriza por apresentar um máximo de absorção em 418-420nm e na presença de xenobióticos têm suas concentrações diminuídas sugerindo que seja uma hemoproteína de características espectrais semelhantes ao do P450. A purificação do citocromo P450 através de uma coluna de hidrofobicidade acoplada em HPLC se mostrou eficaz, mas não foi possível identificar as isoformas presentes no sistema. O método enzimático detectou apenas a presença da CYP1A. Todos os xenobióticos levaram à diminuição do conteúdo dos citocromos b5 e P450 dependente do tempo de incubação e da concentração do xenobiótico. As enzimas NADPH citocromo P450 redutase e EROD (CYP1A) foram ativadas pela TFP e marcadamente inibidas pelo Triton X-100 e Tween 80, sugerindo que os xenobióticos interagem com os componentes da membrana microsomal. A TFP foi o único xenobiótico a ser parcialmente metabolizado e, além das alterações da membrana, também leva à inibição seletiva de algumas isoformas do P450, pois foi possível detectar a ativação da EROD (CYP1A). A causa desta inibição seria a interação de metabólitos da TFP com o citocromo P450. O Triton X-100 também destrói o P450 por alquilação do grupamento heme, sugerindo um efeito inibitório do surfactante ainda que na forma de monômeros. A GST foi induzida pelos três xenobióticos indicando a capacidade de Curimatá em detoxificar tais compostos. A análise das enzimas antioxidantes e dos níveis de peroxidação lipídica mostraram que seu uso como ferramenta de biomarcação deve ser sempre associado à atividade de outras enzimas. Portanto, embora o P450 seja um biomarcador em potencial, deve ser analisado conjuntamente com outras enzimas, pois os xenobióticos interagem diferentemente com cada componente do sistema levando à indução de algumas proteínas concomitantemente à inibição de outras.

## **ABSTRACT**

Cytochromes P450 constitute a superfamily of heme proteins that play a vital role in the metabolism of a wide variety of compounds such as steroids, fatty acids, drugs and environmental pollutants. Xenobiotic metabolism and role of cytochrome P450 are important areas of molecular pharmacology and toxicology, and of great interest mainly in the studies on prevention of the damage caused by chemical pollutants. In this work we investigated the interaction of Trifluoperazine, Triton X-100 and Tween 80 with cytochrome P450, phase I and II enzymes and antioxidant defenses in Curimatá, a Brazilian teleost fish. Spectral characterization indicated a possible presence of a heme protein, with similar characteristics of cytochrome P450, in liver of Curimatá; a peak at 418-420nm ("P420") decreased in the presence of xenobiotics. Purification of cytochrome P450 had been succeeded by HPLC on hydrophobic column ( $\mu$ -Bondapak – C18). Only one isoform of P450 – CYP1A – could be detected in Curimatá hepatic microsomes. EROD and NADPH cytochrome P450 reductase were strongly inhibited by Triton X-100 and Tween 80 in a time- and concentration-dependent way. Triton X-100 and Tween 80 inactivated the system by interacting with the membrane. In the case of Triton X-100, that cause the alkylation in the heme moiety, P450 inactivation occurred even in monomers. However these enzymes were activated by Trifluoperazine (TFP) suggesting that only TFP was being metabolized by P450 system and that its metabolites could interact with P450 and inactivated it. Glutathione-S-Transferase, a phase II enzyme, was activated by the xenobiotics, suggesting that Curimatá could metabolize these compounds. Analyses of antioxidant enzymes activities, lipoperoxidation levels and P450 contents showed a non-significative correlation between antioxidant effects and P450 system. Our results suggested that P450 is a potential biomarker of xenobiotic exposure, but its use need to be associated with other enzymes because xenobiotics can distinctly interact with each component of the system leading to the activation of some enzymes and inhibition of others.

---

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – POLUIÇÃO AMBIENTAL E OS CONCEITOS DE BIOMARCADORES

A crescente expansão demográfica e o desenvolvimento industrial comprometeram a qualidade dos diferentes ecossistemas do planeta, em especial os aquáticos, onde ocorre o despejo de diferentes produtos químicos de origem industrial e doméstica.

De acordo com a classificação da CETESB (Companhia Tecnológica de Saneamento Ambiental) tais despejos podem ser: físicos, como os agentes corrosivos; químicos, como os resíduos tóxicos de origem industrial e os pesticidas agrícolas; e orgânicos, incluindo os fertilizantes, restos de refinaria, produtos de esgoto e o lixo doméstico. Os poluentes que compõem estas duas últimas categorias são responsáveis por 80% da poluição aquática, pois uma vez lançados aos rios provocam alterações de parâmetros como dureza, pH, turgidez, oxigênio disponível, concentração de nutrientes etc. (<http://www.cetesb.com.br>).

O Brasil, assim como a maioria dos países, é deficiente em recursos que previnam e tratem os problemas causados pelo despejo de resíduos tóxicos no ambiente. Contudo a preocupação crescente em encontrar meios que contenham a poluição ainda em níveis iniciais e evitar seu contato com a população fez crescer, a partir de 1950, as pesquisas em tecnologias para a prevenção da contaminação ambiental (Goldfarb et al., 1998).

Muitos autores definem poluição como a presença de quantidades elevadas de constituintes naturais, ou não, no ecossistema. Por serem substâncias estranhas ao meio e aos organismos tais compostos são chamados tecnicamente de xenobióticos (xeno = estranho; biótico = relativo à vida) (Cousinou et al., 2000).

Os xenobióticos naturais incluem uma grande variedade de produtos de origem vegetal — como os terpenos e os alcalóides, as toxinas animais e os hidrocarbonetos naturais. Quando existentes em baixas concentrações no ecossistema, estes compostos são importantes desencadeadores de processos evolutivos que podem levar à adaptações fisiológicas e comportamentais (Calow & Forbes, 1998, Livingstone, 1998).

Os xenobióticos antropogênicos podem ser dispersos no ecossistema por várias rotas, dentre elas a atmosférica, descarga direta (lixo industrial ou esgoto lançados diretamente na água) ou indireta, através da cadeia alimentar. Esta última forma de dispersão explica-se pelo fato de que grande parte dos xenobióticos é pouco solúvel em água e, portanto, facilmente acumulado nos organismos (Livingstone, 1998).

A preocupação com o meio ambiente intensificou a procura por meios de monitoramento ambiental mais rápidos e eficientes. Ao focar apenas a análise química dos níveis de poluentes na água ou no sedimento, os métodos tradicionais forneciam pouco ou nenhum indício do efeito dos poluentes na fauna e flora, pois tais procedimentos não levavam em conta as alterações sofridas pelo organismo em relação às mudanças químicas no meio (Goldfarb et al., 1998). A fim de solucionar estes problemas, pesquisas procurando indicadores biológicos de qualidade de água têm crescido exponencialmente nos últimos anos.

Indicadores biológicos são definidos como variáveis bióticas que podem ser medidas informando a presença de uma resposta a algum agente estressante que pode ser desde o derramamento de poluentes até a alteração das concentrações dos gases respiratórios (Adams, 1990). O que sustenta o uso do biomonitoramento é o fato de que distúrbios conseqüentes do contato do organismo com o xenobiótico levam a perturbações mensuráveis no comportamento, na fisiologia, na bioquímica e na morfologia do organismo.

---

Entre as ferramentas usadas no biomonitoramento, duas vêm demonstrando resultados promissores: os bioindicadores e os biomarcadores. São considerados bioindicadores os organismos cuja resposta associada ao impacto de um contaminante seja mensurável ao nível da espécie, analisando-se parâmetros comportamentais ou morfológicos. Quando a resposta é medida em níveis inferiores de organização biológica, como por exemplo, as alterações da atividade de uma enzima, utiliza-se o termo biomarcador (Adams, 1990, den Besten, 1998, Goldfard et al., 1998).

Os biomarcadores são ferramentas de monitoramento em qualquer ecossistema, em especial no aquático. No entanto, as respostas são potencializadas quando se usa o biomarcador certo e no local certo para que a resposta mensurável seja real (den Besten, 1998). Vários autores demonstraram que muitos organismos quando expostos a poluentes sofrem um aumento nas enzimas da fase I da biotransformação, nas enzimas antioxidantes e na lipoperoxidação. Em longo prazo, é possível um aumento de neoplasias que refletem danos na estrutura do DNA (Ueng et al., 1995, Koblyakov, 1998, Machala et al., 1998, Quabius et al., 1998, Williams et al., 1998, Au et al., 1999). As informações obtidas com o uso de marcadores biológicos podem ser utilizadas para sinalizar, controlar ou prever os efeitos dos poluentes. No entanto, a atividade desta ferramenta pode ser afetada, ou não, por certos tipos de agentes fazendo com que um número limitado de biomarcadores seja válidos para inclusões em programas de monitoramento (Thomas, 1990, den Besten, 1998). A Tabela 1 resume os principais tipos de biomarcadores e quais as situações em que eles podem ser usados.

O papel maléfico dos xenobióticos vem sendo estudado desde a década de 50. Atualmente é comprovado que tais compostos podem alterar a atividade de diferentes enzimas, inibindo ou estimulando a produção de substâncias importantes (como os hormônios), e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio, alterando assim todo funcionamento do organismo e desencadeando um quadro de estresse. Esta desestruturação é possível porque

os xenobióticos se ligam às proteínas através de interações covalentes ou por apresentarem estrutura química similar a de compostos importantes como os hormônios sexuais, podendo desta maneira alterar todo o ambiente celular e os processos metabólicos do organismo (Thomas, 1990, Oruç & Üner, 1999, Paolini et al., 1999).

**Tab. 1 – Conceitos e aplicações dos principais tipos de biomarcadores \***

<b>Conceito</b>	<b>Situação de uso e tipo de resposta</b>	<b>Uso e Requerimentos</b>
Exposição	Processos iniciais de contaminação	Biomarcadores de exposição com especificidade para certos tipos de contaminantes.
Diagnóstico	Sinaliza as possíveis causa e efeitos adversos de um contaminante em certas populações.	A resposta obtida é correlacionada com o “fitness” reprodutivo do organismo estudado
Monitoramento dirigido (monitoramento contínuo)	Mudança da resposta (aumento ou diminuição da indução) de um biomarcador ao longo de um tempo pré-determinado.	Medidas repetidas do mesmo(s) biomarcador(es) em diferentes períodos
Monitoramento de variação espacial (dispersão do contaminante)	Análise de um ou mais biomarcadores em diferentes pontos de um mesmo local atingido.	Uso de “espécie sentinela”, animais comuns da região.
Análise de risco	Prever os efeitos do contaminante em áreas de risco, ou seja, sujeitas ao despejo contínuo.	O mesmo biomarcador em diferentes organismos que habitem o mesmo local.

\* Adaptado de den Besten, 1998.

Normalmente, estudos *in vitro* se assemelham muito ao monitoramento dirigido, pois analisam alterações na resposta de um biomarcador em diferentes períodos de incubação. Muitas vezes realiza-se um estudo prévio do biomarcador a ser analisado através de ensaios *in vitro* antes de partir para o monitoramento no campo. Estes estudos são necessários para que se conheça o comportamento do biomarcador de interesse em diferentes situações.

Enzimas, proteínas e cofatores envolvidos na ligação, biotransformação e excreção de xenobióticos têm sido propostos para serem usados como biomarcadores de poluição. As enzimas da fase I (sistema microsomal hepático – citocromo P450), as da fase II da biotransformação (Glutathione-S-Transferase, UDP-glucuronosil transferase, acetil transferase) e as enzimas do estresse oxidativo (Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase) são estudadas em diferentes organismos para serem validadas como biomarcadores de exposição a xenobióticos (Jimenez & Stegeman, 1990, Thomas, 1990, Livingstone, 1998, Paolini et al., 1999).

Tradicionalmente, o processo de biotransformação de um xenobiótico é avaliado em estudos *in vivo* usando animais como modelos. No entanto, estudos do metabolismo *in vitro* têm se expandido e são de interesse da indústria farmacêutica para entender como um dado xenobiótico é metabolizado e quais metabólitos podem levar à inibição das enzimas da fase I (Rodrigues & Wong, 1997).

Embora os testes *in vivo* permitam avaliar a toxicidade de um dado xenobiótico no organismo como um todo, os testes *in vitro* vêm ganhando força nos últimos anos devido à sua precisão, já que é possível identificar qual a resposta do meio em concentrações abaixo das detectadas no ambiente. As espécies apresentam sensibilidade variada à um mesmo xenobiótico em um mesmo ambiente, pois a biotransformação é modulada tanto por fatores endógenos como exógenos. Assim, uma espécie que não responda à presença de

um dado xenobiótico no ambiente pode apresentar alterações enzimáticas em testes *in vitro* em virtude do isolamento das variáveis externas, tais como alimentação e temperatura (Isomaa & Lilius, 1995).

Atualmente há um grande interesse na padronização e viabilização de diferentes espécies como bioindicadores de poluição ambiental e no melhor entendimento dos efeitos dos contaminantes no ecossistema. Para isto, contudo, é necessário conhecer quais os danos causados pelos xenobióticos através da integração entre a toxicologia – testes *in vitro* – e a ecologia – testes *in vivo*.

## **1.2 – BIOTRANSFORMAÇÃO**

A biotransformação é definida como um processo que visa converter um substrato lipofílico em um composto mais polar e, conseqüentemente, ter seus metabólitos rapidamente excretados. As enzimas envolvidas no metabolismo de compostos tóxicos têm uma variedade de substratos e a sua atividade depende da semelhança entre os compostos endógenos e o xenobiótico (Cousinou et al., 2000, Timbrell, 2000).

A maioria dos xenobióticos atinge o organismo através da via gastro-intestinal e, neste sentido, o fígado é o principal órgão de biotransformação devido à sua posição, suprimento de sangue e função. As enzimas envolvidas na biotransformação estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático liso e no citossol das células hepáticas; em número menor estão presentes ainda nas mitocôndrias e em outras organelas. (Vrolijk et al., 1994, Bainy, 1996, Goksøyr & Husøy, 1998, Machala et al., 1998, Quabis et al., 1998, Au et al., 1999, Cousinou et al., 2000, Timbrell, 2000).

O metabolismo oxidativo é a primeira etapa do processo de biotransformação, sendo catalisado por dois grupos de monooxigenases: as

flavoproteínas monooxigenases e o sistema microsomal P450. Nesta primeira fase ocorre a alteração da estrutura da molécula original através da adição de grupos funcionais (-OH, COOH, etc) que a tornam menos hidrofóbica (Bainy, 1996, Stegeman & Lech, 1991). A inserção destes grupos leva à produção de metabólitos com alta solubilidade, podendo provocar não só a inativação do composto, mas também a ativação de compostos pró-carcinogênicos (Cousinou et al., 2000, Stegeman & Lech, 1991, Koblyakov, 1998, Graham & Peterson, 1999).

Na fase II esta molécula estruturalmente diferente será conjugada com compostos endógenos e polares, tornando-a mais hidrofílica, menos tóxica e facilmente excretável (Vrolijk et al., 1994, Iyer & Sinz, 1999, Timbrell, 2000).

### **1.2.1 – SISTEMA MICROSSOMAL HEPÁTICO - P450**

As reações da fase I da biotransformação são catalisadas principalmente pelo sistema P450 de monooxigenases, localizado na membrana do retículo endoplasmático liso das células. A complexidade desta organela está relacionada a sua superfície bidimensional que possui uma distribuição heterogênea de proteínas e lipídios, sendo a densidade de proteínas correspondente a 70% do peso total da membrana (Hird et al., 1964, De Pierre & Ernster, 1977, Peterson & Prough, 1986).

Este sistema enzimático pode ser isolado em frações microsomais, no caso, vesículas de aproximadamente 100 nm obtidas através de uma seqüência de homogeneização e ultracentrifugações que levam à fragmentação e resselamento do retículo endoplasmático em vesículas conhecidas como microsomas que mantêm as mesmas características e composição do retículo endoplasmático na célula (De Pierre & Ernster, 1977, Alberts et al., 1994, Timbrell, 2000). O sistema microsomal hepático é composto por três flavoproteínas (NADPH-citocromo P450 redutase, NADH-citocromo b5-redutase e N-oxidase) responsáveis pela transferência de elétrons e, duas hemeoproteínas, o

citocromo P450, uma monooxigenase, e o citocromo b5, que quando reduzido é capaz de doar seus elétrons para o oxi-P450 (Estabrook, 1978).

Microsomas hepáticos catalisam uma grande variedade de reações de oxidação, como por exemplo, a hidroxilação de compostos aromáticos e alifáticos, a N-oxidação de drogas, etc. Todas estas reações são possíveis graças à associação dos diversos componentes do sistema microsomal e são catalisadas pelo citocromo P450, em especial os da subfamília 1A e 3A (Estabrook, 1978, Vrolijk et al., 1994, Riviere & Cabanne, 1987, Koblyakov, 1995, Iyer & Sinz, 1999, Omura, 1999).

O termo "citocromo P450" foi usado pela primeira vez em 1962 para identificar uma heme proteína com características únicas, valendo-lhe o nome de pigmento microsomal ligante ao monóxido de carbono ("microsomal carbon monoxid-binding pigment") (Omura & Sato, 1964a, Omura & Sato, 1964b, Bernhardt, 1995, Omura, 1999). A característica clássica dos P450 é a posição peculiar do seu pico de Soret em 450 nm como resultado da formação do complexo Fe(II)-CO – surgindo desta constatação o nome P450 (Omura & Sato, 1964a, Omura & Sato, 1964b, Mansuy, 1998).

O grupamento heme do citocromo P450 é derivado da protoporfirina IX, o que parece contribuir para as suas características espectrais únicas (Mansuy, 1998, Omura, 1999). Tais características espectrais também são atribuídas à presença da cisteína, histidina e do ânion tiolato ligados ao ferro-heme. O 5º ligante do ferro-heme é o responsável por gerar o espectro característico do P450 reduzido e complexado com monóxido de carbono e graças aos avanços das técnicas de cristalografia de proteínas e da biologia molecular hoje se sabe que este quinto ligante do ferro é o ânion tiolato de um resíduo de cisteína (Omura, 1999).

Quando a estrutura do P450 é perturbada por agentes como os surfactantes, o ânion tiolato do resíduo de cisteína é facilmente deslocado junto com o anel imidazol do resíduo de histidina, deslocando o pico de 450nm para 420nm – semelhante à hemoglobina - e gerando a forma P420 que é inativa (Omura & Sato, 1964a, Omura & Sato, 1964b, Nebert & Gonzalez, 1987, Graham-Lorence & Peterson, 1996, Graham, & Peterson, 1999, Omura, 1999). O citocromo P420 pode ser gerado não só por alterações no microambiente do grupamento heme; a desestabilização da membrana do retículo endoplasmático também é responsável por deslocar o pico de 450nm para 420nm, o que demonstra a grande influência do ambiente lipídico para o funcionamento do citocromo P450 (Nebert & Gonzalez, 1987, Benhardt, 1995, Omura, 1999).

Os avanços na área de biologia molecular permitiram o enriquecimento no conhecimento da estrutura e da seqüência de aminoácidos de diferentes P450, o que exigiu a criação de uma nomenclatura particular para especificar os diferentes tipos de P450s baseada na homologia estrutural. P450s de diferentes fontes, mas com mais de 40% de homologia entre as seqüências são incluídos na mesma família, que é identificada por um algarismo arábico. Quando a homologia é superior a 55% as proteínas são incluídas na mesma subfamília, identificada por uma letra de forma capital. Por exemplo: *CYP1A*, identifica os genes dos citocromos P450 da família 1 e subfamília A, a identificação da enzima é a mesma, mas sem o itálico (Coon et al., 1992).

P450s são essenciais para todos os organismos vivos, tanto procariontes quanto eucariontes. Neste último grupo sua importância é ainda maior por estar envolvido ativamente na síntese de esteróides e ácidos graxos, indispensáveis para a composição da membrana plasmática. Devido a esta constatação acredita-se que o P450 teve um papel importante na transição de procariontes para eucariontes, quando passou a desempenhar outros papéis além da síntese de compostos biologicamente ativos (Nebert & Gonzalez, 1987, Nebert et al., 1989).

Em organismos eucariontes, os P450 se encontram embebidos principalmente na membrana do retículo endoplasmático liso e na membrana interna da mitocôndria. Em ambos os casos esta ancoragem na membrana se dá através de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. No entanto, a composição do sistema das monooxigenases no retículo endoplasmático é diferente da mitocondrial, conferindo a estes P450s diferentes funções. Enquanto o P450 mitocondrial está envolvido na síntese de esteróides e clivagem de colesterol, o P450 microsomal atua principalmente na biotransformação de xenobióticos (Black, 1992, Coon et al., 1992, Omura, 1999).

O P450 é capaz de realizar uma série de reações de oxidação, como demonstrado na Figura 1. Isto é possível graças a duas propriedades desta heme-proteína: (i) habilidade do ferro em apresentar um grande número de estados de oxidação com diferentes reatividades, (ii) acessibilidade do seu grupamento ferro a um grande número de substratos (Mansuy, 1998).

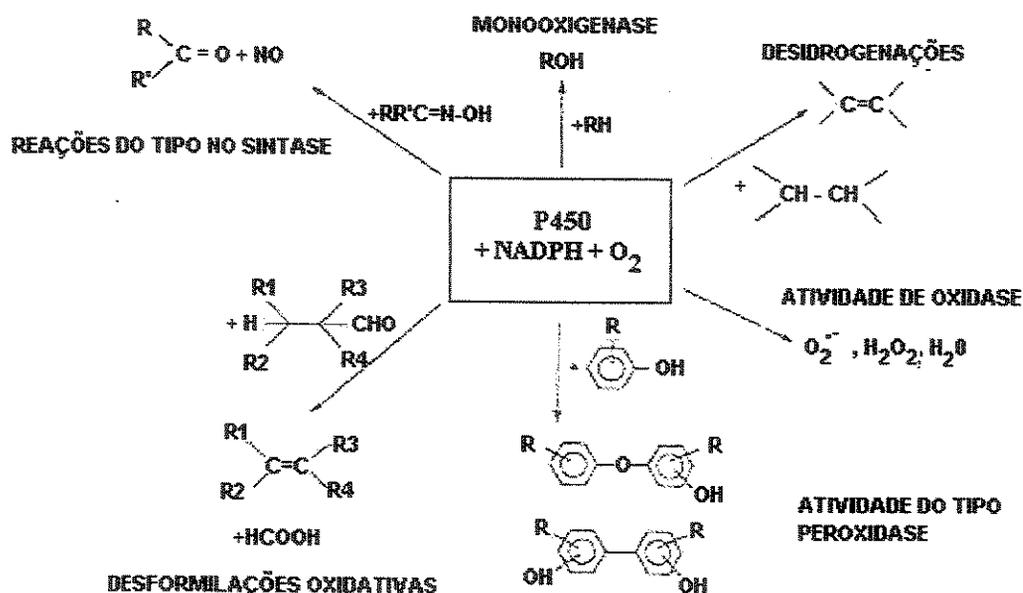
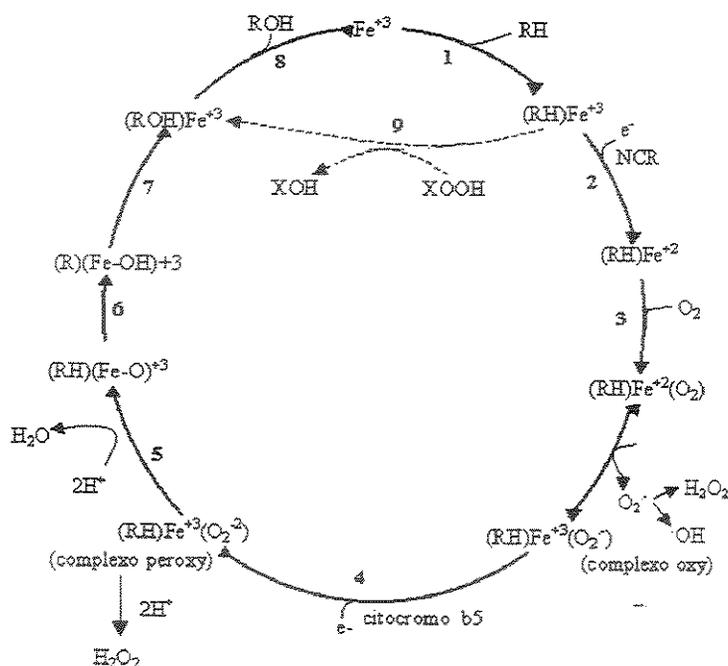


Fig.1 – Esquema das reações catalisadas pelo citocromo P450 (adaptado de Mansuy, 1998).

A reação clássica do P450 envolve a transferência dos seus átomos de oxigênio para o substrato – daí ser denominada monooxigenação. A ativação deste sistema necessita de dois equivalentes redutores que chegam até o P450 por dois passos redutores distintos. No primeiro, o elétron é transferido do NADPH para o citocromo P450 através da enzima NADPH citocromo P450 redutase. Já o segundo elétron pode vir de várias fontes, embora o doador mais comum seja o citocromo b5 através da enzima NADH citocromo b5 redutase. Estas transferências geram espécies reativas do oxigênio na forma de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Fig.2), que por sua vez podem causar danos ao organismo por serem precursores do radical hidroxil (Coon et al., 1992, Guengerich et al., 1995, Guengerich et al., 1998, Koblyakov, 1998, Omura, 1999).

A NADPH citocromo P450 redutase é uma flavoproteína que foi inicialmente identificada pela sua habilidade em oxidar o NADPH e reduzir o citocromo c. Esta enzima tem dois domínios: um hidrofóbico e outro hidrofílico. A NADPH citocromo P450 redutase é reduzida em quatro etapas que transferem um elétron por vez, gerando no fim do processo um espectro com máximo de absorção em 585nm (Peterson & Prough, 1986, Sevrioukova & Peterson, 1995).



**Fig.2** - Ciclo catalítico do citocromo P450. (1) Ligação do substrato (RH) ao citocromo P450 ( $\text{Fe}^{+3}$ ); (2) redução monoelétrica do complexo enzima-substrato pela enzima NADPH citocromo P450 redutase (NCR); (3) ligação do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) ao complexo enzima-substrato. Enquanto um átomo do oxigênio molecular é introduzido no substrato, o outro é reduzido até água gerando espécies reativas do oxigênio, tais como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); (4) transferência do segundo elétron para o complexo enzima-substrato através do citocromo b5; (5) protonação do complexo enzima-substrato com liberação de peróxido de hidrogênio; (6) clivagem da ligação O-O gerando um intermediário reativo; (7) inserção de um átomo de oxigênio no substrato (monooxigenação); (8) dissociação do produto e liberação do citocromo P450; (9) reação de hidroxilação sem a necessidade de equivalentes redutores. Em destaque as espécies reativas geradas pelas reduções do ciclo (adaptado de Benhardt, 1995).

Vários estudos afirmam que na presença de substrato há uma interação entre o P450 e a sua redutase através de uma mudança conformacional no grupamento heme desta proteína. O papel da NADPH citocromo P450 redutase é crucial para ativação do P450 porque qualquer alteração nesta etapa do ciclo catalítico pode provocar a inativação do P450 devido à diminuição da interação

entre estes dois componentes (Nebert & Gonzalez, 1987, Nebert et al., 1989, Yamada et al., 1999).

O citocromo b5 é uma hemeproteína intrínseca localizada na face externa da membrana microssomal. Esta proteína, um polipeptídeo com massa molecular ao redor de 16.000Da, é composta por dois domínios: um globular e hidrofílico no qual encontra-se o grupamento heme e, um segundo fragmento composto por aminoácidos hidrofóbicos responsáveis pelo ancoramento do citocromo na membrana microssomal (Robinson & Tanford, 1975, Garda & Brenner, 1984, Peterson & Prough, 1986).

Além de atuar como doador do segundo elétron necessário para a redução do citocromo P450 durante seu ciclo catalítico, estudos recentes demonstraram que há uma interação na membrana microssomal entre o citocromo b5 e algumas formas de P450 formando um heterodímero que, além de aumentar a velocidade da detoxificação, também impede as taxas de fosforilação do P450, reação que poderia levar a sua destruição (Chiang, 1981, Jansson et al., 1990, Jansson & Schenkman, 1996). Quando reduzida esta hemeproteína apresenta um máximo em 423-424 nm, característico do citocromo (Garda & Brenner, 1984, Peterson & Prough, 1986). Além de participar dos processos de oxidação de drogas, o b5 também participa da síntese de alguns fosfolipídios, o que explica o fato deste citocromo ser amplamente distribuído entre os tecidos e localizados em diversos compartimentos celulares (Peterson & Prough, 1986).

O papel do citocromo b5 na oxidação de drogas pelo sistema microssomal vem sendo pesquisado há muito tempo através de estudos cinéticos, imunoquímicos e sistemas reconstituídos de proteínas purificadas. Tais estudos procuram provar que o b5 também pode ser usado como biomarcador microssomal de oxidação de drogas e, por consequência, um biomarcador de exposição a xenobióticos (Chiang, 1981, Peterson & Prough, 1986, Guengerich et al., 1995, Jansson & Schenkman, 1996).

A indução da resposta dos P450s a um dado xenobiótico, em especial aos policíclicos aromáticos em sistemas *in vivo*, é mediada através de um receptor citossólico (Ah) que ao interagir com o xenobiótico, forma um complexo receptor-xenobiótico que se liga em seguida em regiões específicas do DNA provocando o aumento da transcrição de RNA mensageiro. O tempo de indução varia entre os organismos estudados e o agente indutor, o que torna pertinente um estudo prévio do organismo que se pretende utilizar como bioindicador (Coon et al. 1996, Omura, 1999). Em estudos paralelos desenvolvidos neste laboratório, observamos que peixes coletados em locais poluídos apresentavam níveis de P450 e b5 até 7 vezes maiores quando comparados com peixes coletados em criadouros artificiais (Leitão et al., 2000). As subfamílias 1A e 2B são as principais responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos. Estas isoformas estão localizadas nos tecidos que estão em contato direto com as substâncias vindas do exterior, como o trato gastro-intestinal, o fígado, a pele, os rins, etc (Vrolijk et al., 1994, Iyer & Sinz, 1999).

Em estudos *in vitro* de biomarcação não se estuda a indução do sistema uma vez que os microsomas constituem um sistema desprovido de núcleo e RNA mensageiro, responsáveis pela síntese “de novo” de proteínas. Nestes casos analisa-se a capacidade do sistema microsomal em catalisar as reações de oxidação e biotransformação de compostos tóxicos.

### **1.2.2 – ENZIMAS DA FASE II – GLUTATIONA –S - TRANSFERASE**

As duas enzimas de maior atuação durante a fase II da biotransformação são a Glutationa – S – Transferase (GST) e a UDP-glucuronosil transferase (UGT). Ainda que ambas trabalhem na conjugação dos compostos gerados na fase I da biotransformação, se diferenciam quanto à localização celular. Enquanto a UGT encontra-se na membrana microsomal, a GST é uma enzima citossólica (Iyer & Sinz, 1999, Timbrell, 2000).

A Glutathione S-Transferase é uma enzima constituída por duas subunidades com massa molecular entre 24.000 e 28.000Da e se caracteriza por desempenhar um importante papel fisiológico na neutralização dos epóxidos gerados na fase I da biotransformação, tornando-os mais hidrofílicos. Quando a solubilidade do composto é alta, as interações covalentes entre estes epóxidos e moléculas importantes como o DNA e as proteínas diminuem, reduzindo assim o potencial carcinogênico de muitos xenobióticos (Habig et al., 1974, Le & Franklin, 1997, Van Bladeren, 1997, Hu et al., 1998).

Em mamíferos são encontradas várias isoformas da GST, que comumente são divididas em quatro classes – alfa,  $\mu$ , pi e teta - conforme suas estruturas, propriedades catalíticas, especificidade por substrato e localização tissular. No fígado a concentração intracelular da GST gira em torno de 0,1mM, revelando sua importância no metabolismo de vários xenobióticos (Habig et al., 1974, Kolm et al., 1995, Rompelberg et al., 1996, Van Bladeren, 1997, Hu et al., 1998, Cummings et al., 2000).

A estrutura química do xenobiótico influencia muito na magnitude da resposta da enzima. Compostos nitroheterocíclicos se caracterizam por levarem a uma indução seletiva da GST, enquanto que os fenólicos, originados de plantas normalmente inibem a atividade da enzima (Oetari et al., 1996, Le & Franklin, 1997).

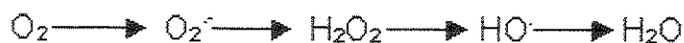
O uso da GST como biomarcador de poluição ambiental vêm crescendo nos últimos anos quando se intensificaram as pesquisas que enfocavam as enzimas da fase II da biotransformação. Atualmente se sabe que uma alta atividade da GST na presença de um dado composto pode indicar seu poder carcinogênico, mesmo que as enzimas da fase I não apresentem um alto grau de indução.

### 1.3 – A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO PELO SISTEMA P450

A bioquímica dos intermediários do oxigênio ( $O_2$ ) é um importante campo da biologia, uma vez que o  $O_2$  é um componente essencial para os organismos vivos. Todos os tecidos aeróbicos produzem espécies reativas do oxigênio em vários tipos de reações, mas quando essa produção é excessiva cria-se um quadro de estresse oxidativo que pode ser gerado não só por alterações endógenas do organismo, mas também por fatores antropogênicos, como o contato com poluentes através da inalação de gases tóxicos, absorção pela epiderme ou ainda pela ingestão de alimento e água contaminados (Gracy et al., 1999).

A característica cinética do oxigênio é a principal responsável pela geração das espécies reativas. Esse processo pode ser catalisado por metais de transição como o Fe e/ou Cu que também apresentam elétrons desemparelhados no orbital mais externo (Cadenas, 1989, Storey, 1996, Qian & Buettner, 1999, Timbrell, 2000).

Diferentes autores definem espécies reativas do oxigênio como um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados no orbital mais externo. Para adquirirem estabilidade tais elétrons unem-se a uma molécula, chamada portadora, que passa a adquirir uma alta reatividade (Cadenas, 1989, Storey, 1996, Mates, 2000). Esses intermediários surgem porque os dois  $e^-$  que o oxigênio necessita só podem ser recebidos um por vez, levando a reduções sequenciais como as mostradas abaixo.



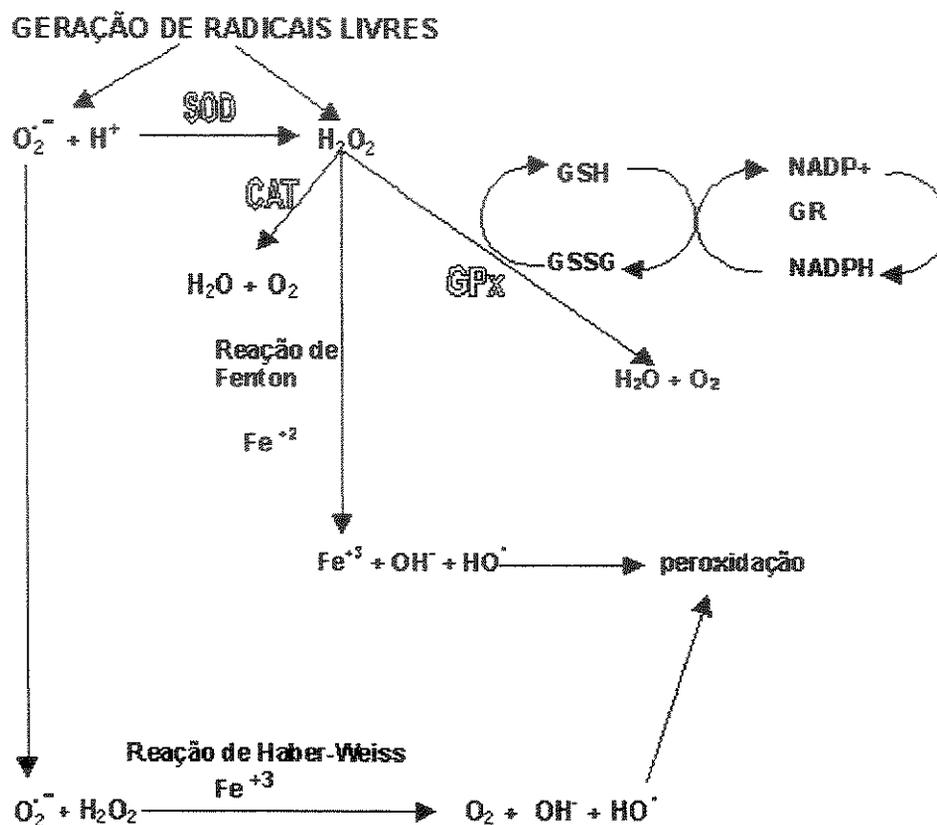
Embora as mitocôndrias sejam uns dos principais sítios de produção de espécies reativas do oxigênio devido à cadeia de transporte de elétrons, outras partes da célula também podem produzi-las, entre elas as membranas microssomais através do ciclo catalítico do P450 e a peroxidação lipídica. Esta geração contínua de espécies reativas do oxigênio faz com que todos os organismos possuam uma gama de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Cadenas, 1989, Pérez-Campo et al., 1993, Storey, 1996, Hermes-Lima, 1998, Gracy et al., 1999).

O citocromo P450 é o principal produtor de espécies reativas do oxigênio nas células hepáticas. Durante seu ciclo catalítico há diferentes reações que podem gerar espécies altamente reativas (Fig.2), como por exemplo, o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), formado durante a primeira redução monoeletrônica, e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), formado depois da protonação do oxi-P450 ou pela dismutação do  $O_2^-$  (Benhardt, 1995, Puntarulo & Cederbaum, 1996, Puntarulo & Cederbaum, 1998, Bayol-Denizot et al., 2000).

A reação entre o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio gera o radical hidroxil (OH $\cdot$ ), que também pode ser formado através das reações catalisadas pelo P450. Todas estas moléculas têm grande importância fisiológica e patológica, já que a alta reatividade destas espécies faz com que elas se liguem fortemente a macromoléculas importantes como as proteínas, o DNA e os lipídios. Essas ligações podem iniciar uma cascata de reações que ativarão fatores de transcrição gênica responsáveis pela sinalização de genes iniciadores de processos mitóticos que, futuramente, poderão provocar o surgimento de neoplasias (Cadenas, 1989, Junqueira et al., 1997, Koblyakov, 1998, Gracy et al., 2000).

Os metais de transição também podem provocar a iniciação de processos oxidativos, como a peroxidação lipídica, ao se conjugarem com o radical ânion superóxido (Reação de Haber-Weiss) e com o peróxido de

hidrogênio (Reação de Fenton), como podemos observar na Figura 3 (Timbrell, 2000).



**Fig.3** - Reações de geração e detoxificação das principais espécies reativas do oxigênio (adaptado de Storey, 1996).

A alta concentração de espécies reativas do oxigênio produzidas pelo ciclo pode levar à inibição do mecanismo catalítico do P450; tal constatação ocorre apenas em situações especiais, como, por exemplo, quando há altas concentrações de xenobióticos no meio. Uma das hipóteses para explicar esta inativação seria a interação do radical ânion superóxido com o grupamento heme dos componentes do SMH, o que leva à inativação da proteína porque altera seu estado de oxidação (Benhardt, 1995, Farombi, 2000).

Estudos recentes têm demonstrado que existe uma certa relação entre os níveis de indução do P450 e o aumento das espécies reativas do oxigênio, detectadas pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes, fator que viabiliza assim o seu uso como marcadores de estresse oxidativo causado por xenobióticos (Puntarulo & Cederbaum, 1996, Junqueira et al., 1997, Dwivedi et al., 1998, Puntarulo & Cederbaum, 1998, Farombi, 2000).

#### **1.4 – DEFESAS ANTIOXIDANTES EM PEIXES**

Segundo a definição de Sies (1993), um antioxidante é qualquer substância que presente em baixas concentrações, quando comparado com um substrato oxidável, pode inibir ou diminuir a oxidação do mesmo.

A detoxificação de uma espécie reativa do oxigênio pode ocorrer através de dois mecanismos: (i) não enzimático, são substâncias sintetizadas pelas células e incorporadas pela dieta, apresentando características hidrofóbica ou hidrofílica; (ii) enzimáticos, presentes principalmente nas células eucarióticas. Entre os antioxidantes enzimáticos os mais conhecidos são Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase (Sies, 1993, Wilhelm-Filho & Marcon, 1996, Fraga et al., 1996, Matés, 2000).

A Superóxido Dismutase (SOD – EC 1. 15.1.1) é considerada uma das enzimas mais importante pelo fato de atuar sobre o radical  $O_2^{\cdot-}$ , o primeiro a ser formado no processo de redução do  $O_2$  até  $H_2O$  e na primeira redução do citocromo P450 (Fig.2 e Fig.3). A síntese desta enzima é induzida quando há um aumento da produção do radical ânion superóxido por situações de mudança de  $pO_2$  (hiperóxia ou hipóxia) ou pela ação de xenobióticos. Além disto, Perez-Campo et al. (1993) demonstraram que a SOD têm uma atividade mais expressiva em endotérmicos do que em ectotérmicos devido às diferenças de taxas metabólicas

(Fridovich, 1978, Flohé & Ötting, 1984, Livingstone et al., 1993, Benhardt, 1995, Marcon, 1996, Hermes-Lima, 1998, Matés, 2000).

A Catalase (CAT – EC 1.11.1.6) é responsável por degradar o  $H_2O_2$  produzido pelo organismo naturalmente e/ou aquele originado da dismutação do radical  $O_2^-$  (Fig.3) (Aebi, 1984, Boveris & Bermudez, 1996, Matés, 2000). No centro ativo da CAT há uma flavo ou heme proteína que parece estar presente em todos os organismos aeróbicos, à exceção de algumas bactérias e algas azuis (Marcon, 1996, Wilhelm-Filho, 1996, Hermes-Lima et al., 1998). Ainda que sua atividade seja constatada em diferentes tecidos, é principalmente no fígado que a CAT se mostra atuante, sendo inclusive influenciada pela capacidade aeróbica do órgão (Perez-Campo et al., 1993, Wilhelm-Filho, 1996). A localização da CAT é citossólica, encapsulada nos peroxissomos. O  $H_2O_2$  localiza-se no citossol e passa através da membrana peroxissomal. O conteúdo da CAT é regulado pela concentração de  $H_2O_2$  livre e pelos níveis intraperoxissomais de CAT (Boveris & Bermudez, 1996).

A Glutathione Peroxidase (GPx) é uma peroxidase que atua principalmente nos peróxidos orgânicos e no  $H_2O_2$  gerados na peroxidação lipídica (Fig.3). Com um grupamento heme no seu centro ativo, a GPx parecer ter sua atividade complementar à da CAT e está ligada a função fisiológica, já que só age contra peróxidos orgânicos e em situações de baixos níveis de estresse oxidativo. A CAT, contudo, não tem esta especificidade, pois age principalmente em situações severas de estresse oxidativo (Fridovich, 1978, Flohé & Gunzler, 1984, Perez-Campo et al., 1993, Matés, 2000).

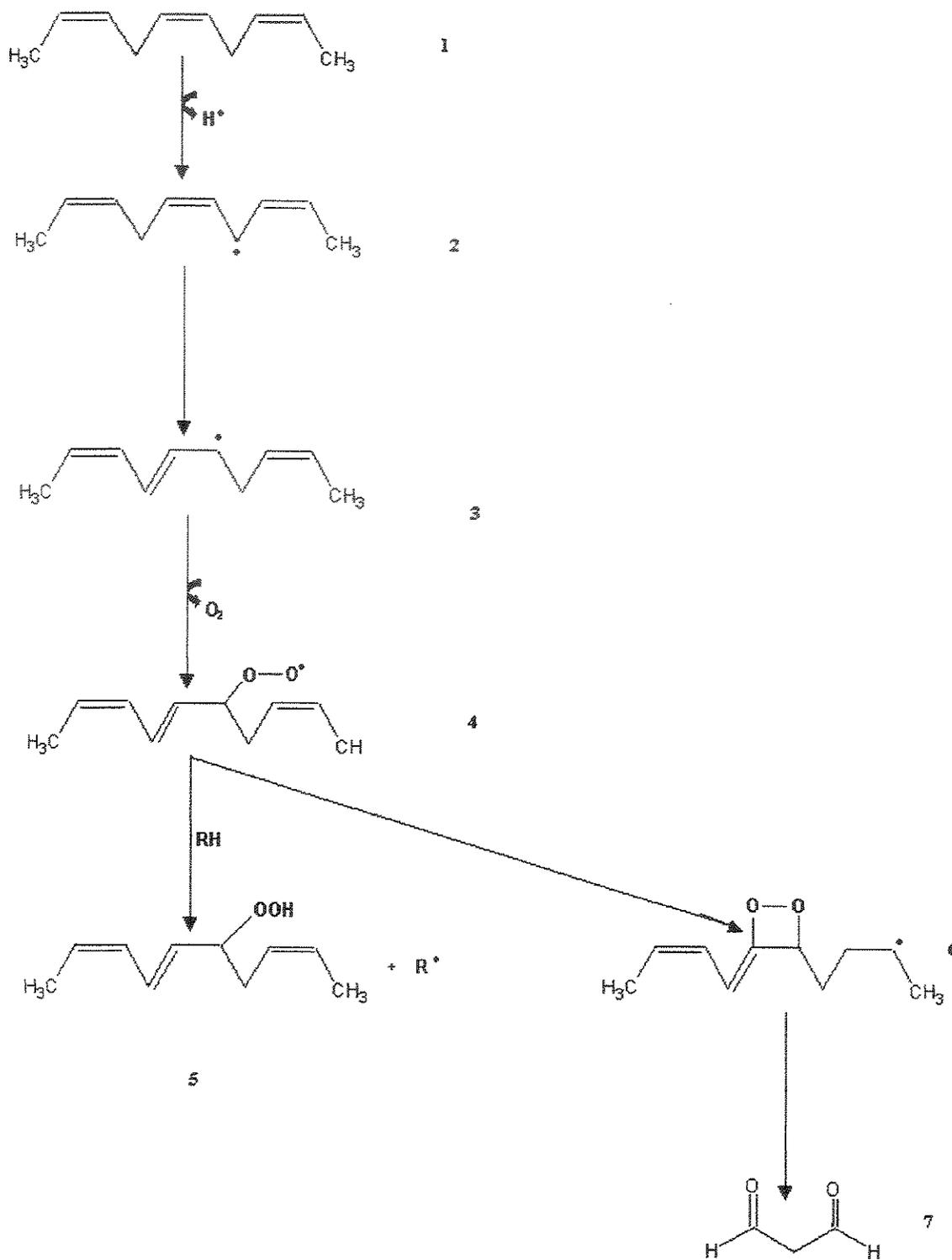
Assim como outros vertebrados, os peixes também possuem antioxidantes enzimáticos com características funcionais e estruturais bastante semelhantes (Storey, 1993, Fraga et al., 1996, Marcon, 1996, Wilhelm Filho, 1996, Wilhelm-Filho & Marcon, 1996, Hermes-Lima et al., 1998). No entanto, as diferenças são marcantes quando se realiza uma comparação em termos

quantitativos: os níveis de enzimas antioxidantes chegam a ser 20X menores do que em mamíferos (Fraga et al., 1996, Marcon, 1996, Wilhelm-Filho & Marcon, 1996, Boveris & Bermudez, 1996).

## **1.5 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM MEMBRANAS MICROSSOMAIS**

Definida como um processo degenerativo dos ácidos graxos da membrana provocada por um radical livre, a peroxidação lipídica é um dos primeiros sinais de que uma célula está sofrendo danos oxidativos. O aumento dos níveis de peroxidação lipídica pode ainda estar ligado com a idade, contato com poluentes e algumas patologias (Ohkawa et al., 1979, Storey, 1996, Hermes-Lima et al., 1998, Timbrell, 2000):

A primeira etapa desta cascata (Fig. 4) é a abstração de um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado formando um radical lipídico (2). Ocorre então o rearranjo das duplas ligações gerando dienos conjugados (3) que serão atacados pelo oxigênio molecular e resultarão num radical peroxilipídico (LOO·) (4). Este radical pode seqüestrar um átomo de hidrogênio de cadeias adjacentes gerando um radical lipídico hidroperóxido (LOOH) (5) ou formar um radical endoperóxido (6). Este endoperóxido contém pontes de metileno interrompidas por duplas ligações que, no final do processo, podem gerar malonaldeído (7) – um radical capaz de se ligar aos aminoácidos das cadeias laterais das proteínas, alterando sua conformação e conseqüente atividade e podendo levar a danos celular (Buege & Aust, 1984, Fraga et al., 1996, Spiteller, 1996).



**Fig.4** – Esquema das reações de peroxidação lipídica em membranas microssomais (Adaptado de Buege & Aust, 1984).

O principal efeito da peroxidação lipídica é a destruição da integridade e da fluidez da membrana, já que os sítios de insaturações estão sendo destruídos. Além disso, os produtos da peroxidação também são hábeis em interagir com outros lipídios ou macromoléculas o que provoca alterações na fluidez da membrana (Spiteller, 1996, Timbrell, 2000).

As membranas estão sujeitas aos danos causados pela peroxidação lipídica devido ao grande número de ácidos graxos polinsaturados. Esta característica, aliada à presença de ferro no centro ativo das proteínas que compõem o SMH e a necessidade de NADPH para as reações de detoxificação, faz com que as membranas microssomais aumentem as taxas de peroxidação lipídica de natureza enzimática (Levin et al., 1973, Buege & Aust, 1984, Ohyashiki et al., 1998, Puntarulo & Cederbaum, 1998, Timbrell, 2000).

Alguns xenobióticos são conhecidos por aumentarem as taxas de peroxidação lipídica após serem metabolizados pelo sistema P450. A peroxidação lipídica também pode levar a destruição do citocromo P450 e de outros componentes do SMH através da ligação dos seus produtos com grupamento heme desta proteína, podendo causar danos no tecido hepático (Levin et al., 1973, Buege & Aust, 1984, Farombi, 2000).

## **1.6 – A BIOTRANSFORMAÇÃO EM PEIXES E SEU USO COMO BIOMARCADOR DE POLUIÇÃO AMBIENTAL**

Peixes representam aproximadamente metade das espécies de vertebrados existentes, divididos em 200 famílias, 32 ordens e 3 classes dentro do subfilo Vertebrata. Esta grande diversidade permite que eles ocupem um número muito grande de nichos no ambiente aquático, além de representarem uma significativa fonte de proteína para os humanos (Wootton, 1992).

Peixes foram escolhidos como modelo biológico por estarem expostos a níveis subletais de contaminantes, temperatura e concentração de oxigênio que, quando são desfavoráveis e/ou flutuantes, causam um estresse fisiológico e comportamental no organismo impedindo a realização de algumas funções importantes, como o fenômeno da piracema. A resposta fisiológica acontece em situações de medo, desconforto ou dor, sugerindo que a origem da indução é psicogênica, ou seja, a resposta é molecular ou bioquímica. Na maioria das vezes os efeitos são acumulativos. Isto ocorre quando o agente estressor é um poluente orgânico que faz com que os peixes exerçam o papel de "depósito" devido à alta lipofilicidade da maioria dos poluentes (Schreck, 1990, Williams et al., 1998, Sandbacka et al., 2000).

Os citocromos P450 desempenham um papel essencial na biotransformação de compostos exógenos e endógenos. Muitos poluentes são capazes de induzir a síntese de P450 em peixes, onde o substrato lipofílico gerado é convertido pelas enzimas de conjugação a um produto mais polar e solúvel em água e facilmente excretado através da urina e brânquias (Gilewicz et al., 1984, Stegeman & Lech, 1991, Vrolijk et al., 1994, Krishnakumar et al., 1995, Gokøyr & Husøy, 1998).

Atualmente diferentes formas de P450 têm sido descritas para várias espécies de peixes marinhos e dulciolas. Em todos eles a forma mais importante para a biotransformação é a CYP1A. Os genes *CYP1A1* e *CYP1A2* estão separados em aproximadamente 250 milhões de anos. Peixes e mamíferos divergem em 400 milhões anos anteriores à separação dos genes CYP1A, sugerindo, portanto que o gene da subfamília de peixes é ancestral a de mamíferos (Nebert et al., 1989, Gokøyr & Husøy, 1998, Buhler & Wang-Buhler, 1998, Watson et al., 1998).

Nas primeiras pesquisas de biotransformação acreditava-se que peixes não apresentavam um sistema microsomal dependente de NADPH e capaz de

detoxificar xenobióticos, já que os níveis de atividade enzimática eram menores. A princípio esta baixa atividade era atribuída à deficiência de alguns componentes do sistema das monooxigenase, mas com os avanços das pesquisas e tecnologias, se descobriu que esta característica está relacionada à influência de fatores externos ao metabolismo dos animais, como a temperatura, modo de forragiamento, tipo de alimento etc. (Buhler & Rasmusson, 1968).

A realização de testes *in vivo* revelou o grande poder de metabolização deste sistema, que é atuante não só no fígado, mas também em outros órgãos extra-hepáticos, como o intestino, as brânquias e os rins. Em virtude do modo de vida dos peixes, tais órgãos entram em contato direto com os xenobióticos e estimulam a atividade das famílias CYP1A, CYP2A, CYP2B e CYP3A (Buhler & Rasmusson, 1968, Riviere & Cabanne, 1987, Stegeman, 1989, Buhler & Wang-Buhler, 1998).

Embora a estrutura dos componentes do sistema P450 e o modo de indução do sistema em peixes e mamíferos sejam bastante semelhante, a sua regulação nos dois organismos é bem diferente (Klotz et al., 1983, Stegeman & Lech, 1991). Enquanto que em mamíferos a regulação é influenciada primordialmente por fatores endógenos (Nebert & Gonzalez, 1987, Halpert, 1995), em peixes os níveis de P450 são mais baixos e influenciados tanto por fatores endógenos como por fatores exógenos. Temperatura, fotoperíodo, mudanças sazonais, dieta, estágio de desenvolvimento e maturação sexual influenciam na magnitude da resposta do P450 e parecem ser essenciais para as defesas contra a toxicidade de compostos químicos (Buhler & Rasmusson, 1968, Riviere & Cabanne, 1987, Stegeman, 1989, Buhler & Wang-Buhler, 1998, Gokøyr & Husøy, 1998, Quabius et al., 1998).

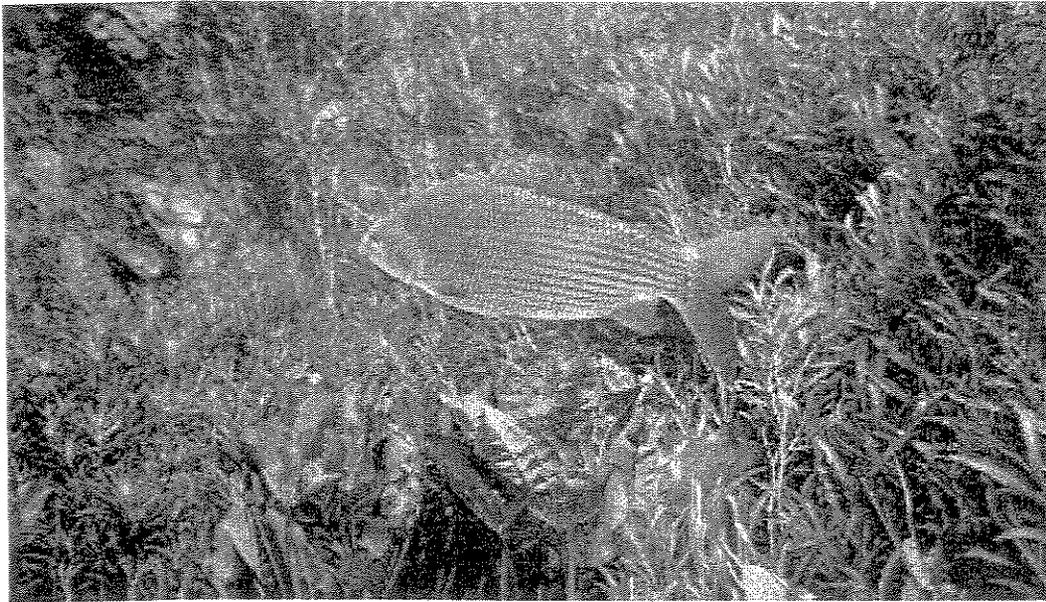
Diversos estudos demonstraram que as alterações dos níveis de indução do P450 em peixes refletem muitas vezes os níveis de contaminantes no ambiente. No entanto, muitas vezes durante o processo de biotransformação o

xenobiótico pode ser ativado, aumentando seu potencial carcinogênico (James, 1989, Livingstone et al., 1989, Stegeman, 1989, Stegeman & Lech, 1991, Beyer & Gokøyr, 1993, Washburn et al., 1994, Vrolijk et al., 1994, Buhler & Wang-Buhler, 1998, Gokøyr & Husøy, 1998, Watson et al., 1998, Williams et al., 1998, Omura, 1999, Pesonem et al., 2000). Graças a esta constatação, é possível afirmar que os níveis de neoplasias podem estar relacionados à indução do P450, porém, em estágios avançados de neoplasias os fígados “doentes” apresentam baixos níveis de P450, pois a capacidade de metabolização do órgão é menor (Pesonem et al., 2000).

### **1.7 – ECOLOGIA DO *Prochilodus scrofa* (PISCES, CHARICIFORME, PROCHILODONTIDAE).**

Pertencente a família Prochilodontidae, os curimatás (Fig.5) estão distribuídos restritamente à América do Sul, em especial nas bacias hidrográficas brasileiras das regiões Sudeste e Centro-Oeste.

Os curimatás são peixes iliófagos, isto é, ingerem substratos formados por lodo e areia que por si só não é alimento, mas sim o local de vida das diatomáceas, uma talófitas que compõe sua maior fonte de nutrientes. Em decorrência estes peixes apresentam estômago musculoso capaz de digerir a carapaça de sílica das diatomáceas (Godoy, 1975, Fernandes et al., 1995).



**Fig.5** - *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), fotografado no Rio Sucuri, Bonito - Mato Grosso do Sul, BR.

Os curimatás são encontrados em ambientes lodosos com baixas pressões de oxigênio e, portanto, muito resistentes a situações de hipóxia, apresentando um "regulador de oxigênio", cuja função é aumentar o volume respiratório. É um peixe reolífico, ou seja, que sobe os rios para se reproduzir quando atinge a maturidade sexual, o que lhe exige numerosas adaptações fisiológicas. Sua resistência também é notada em situações de baixas temperaturas, tolerando viver entre 5 e 10° C quando no seu habitat a temperatura normal é 25°C (Godoy, 1975, Fernandes et al., 1995).

Outra peculiaridade do gênero *Prochilodus* é a presença de um número diplóide de cromossomos  $2n= 54$ , enquanto que o normal é  $2n=40$ , sendo que os cromossomos extras são todos metacêntricos e submetacêntricos. Esta característica ocorre principalmente nos exemplares da Bacia do Paraná que, segundo Godoy (1975), é uma população isolada de *Prochilodus scrofa*,

explicando ainda que o número extra de cromossomos seria uma característica populacional (Pauls & Bertollo, 1990).

## 1.8 – CARACTERÍSTICAS DOS XENOBIÓTICOS ESTUDADOS

Dentre os xenobióticos que mais comumente atingem o meio aquático estão os herbicidas (em especial o DTT), os policíclicos bifenís, os policíclicos aromáticos, as dioxinas e os surfactantes. Enquanto os quatros primeiros são normalmente estudados, os surfactantes, em especial os não-iônicos, não tem recebido muita atenção dos pesquisadores (Sandbacka et al., 2000).

Os três compostos estudados neste trabalho apresentam uma alta lipofilicidade e baixos valores de CMC, como podemos observar na Tabela 2, o que lhes confere características de surfactantes. A Figura 6 mostra a estrutura química dos três xenobióticos estudados neste trabalho.

Tab. 2 – Propriedades físico-químicas dos Xenobióticos estudados

Surfactante	CMC (M)	HLB	MM (g/L)
Trifluoperazina (TFP) <sup>(a)</sup>	$4,2 \times 10^{-5}$	nd	480,4
Triton X-100 <sup>(b)</sup>	$2,5 \times 10^{-4}$	13,5	625,0
Tween 80 <sup>(b)</sup>	$1,2 \times 10^{-5}$	15,0	1310,0

CMC – Concentração micelar crítica, HLB – Balanço Hidrofílico- Lipofílico, MM –Massa molecular, nd – não determinado.

Dados retirados de a) Malheiros et al., 2000, b) Preté, 2000.

Surfactantes se caracterizam por possuírem na mesma molécula uma região polar, ou seja, hidrofílica, e uma região apolar, ou seja, hidrofóbica. A cabeça polar pode ter carga negativa, positiva, ou ainda ser uma cauda de

polioxietileno. A parte hidrofóbica normalmente apresenta uma cadeia de hidrocarbonetos. Esta característica anfipática é a responsável pelos fenômenos de surfactação, micelização e solubilização (Attwood & Florence, 1983).

### 1.8.1 – TRIFLUOPERAZINA (TFP)

Os fenotiazínicos são conhecidos agentes neurolépticos, anti-histamínicos, anticolinérgicos, antidopamina e antiadrenérgicos largamente utilizados na clínica médica (Ruggiero & Meirelles, 1998, Tateishi et al., 1999, Malheiros et al., 2000, Otani & Aoshima, 2000). A Trifluoperazina (Fig.6A) é um derivado de fenotiazínico conhecido por ser um dos agentes antipsicóticos mais eficientes, além disso, prevenir a necrose induzida por  $\text{CCl}_4$  e é um antagonista da calmodulina (Pereira & Vercesi, 1992, Ruggiero & Meirelles, 1998, Malheiros et al., 2000).

A escolha da Trifluoperazina (TFP) como xenobiótico foi feita em virtude da sua estrutura. Este antipsicótico possui um grupamento altamente eletrofílico e uma alta lipofilicidade capaz de desestabilizar membranas biológicas; estas características da TFP são muito semelhantes àquelas apresentadas por muitos poluentes. (Marroum & Curry, 1993, Alvarez et al., 1992, Pereira & Vercesi, 1992, Ruggiero & Meirelles, 1998, Malheiros et al., 1998, Malheiros et al., 2000).

A estrutura da TFP é a principal responsável pelas suas características físico-químicas: o  $\text{CF}_3$  e o enxofre (S) são os principais responsáveis pela sua hidrofobicidade e o anel piperazínico é sensível ao pH, fazendo com que esta molécula em pH 7,4 se apresente protonada. Com isto a TFP passa a agir como um surfactante catiônico em suspensão de membranas (Attwood & Florence, 1983; Malheiros et al., 1998; Malheiros et al., 2000).

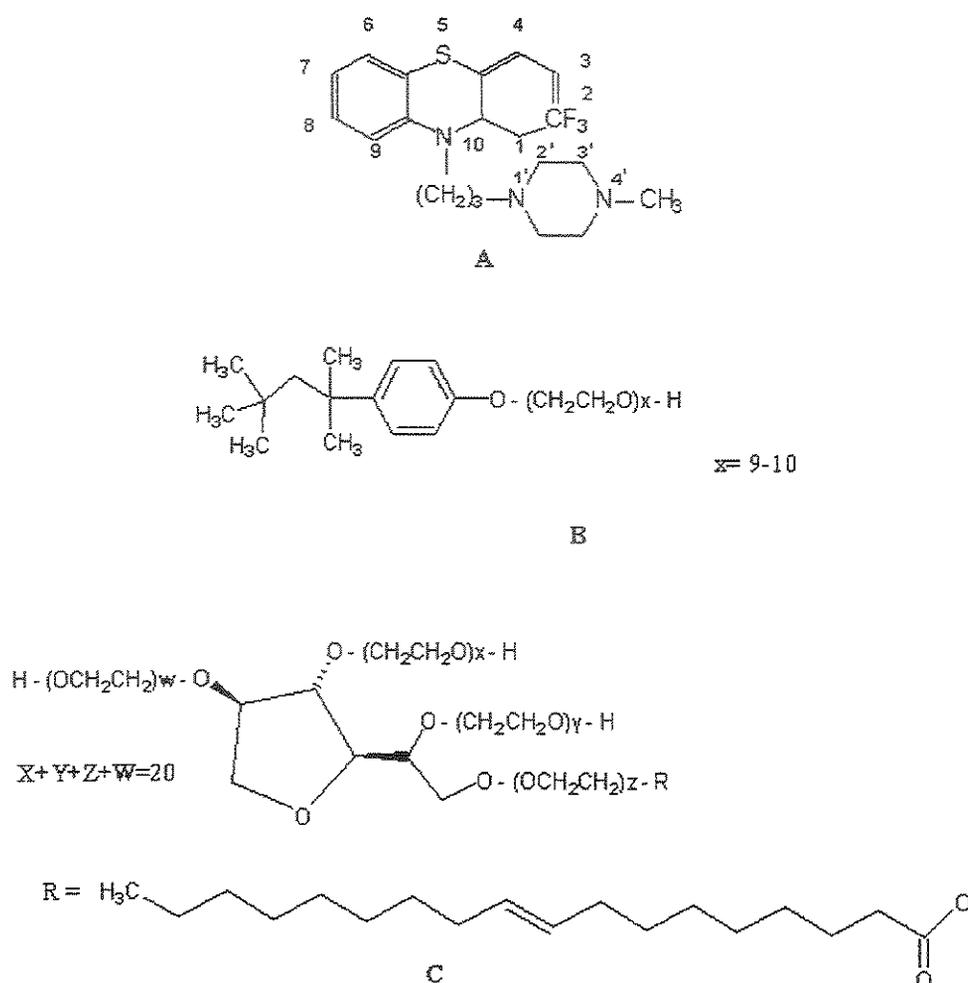
Vários estudos demonstraram que agentes antipsicóticos são metabolizados por diferentes enzimas, que não só o sistema P450. Ensaio *in vitro* demonstraram que os fenotiazínicos induzem o receptor Ah, responsável pela ativação da família CYP1A1 e CYP2B, sugerindo que os fenotiazínicos induzem diferentes isoformas do P450 (Guengerich, 1997, Tateishi et al., 1999, Otani & Aoshima, 2000).

### **1.8.2 – SURFACTANTES NÃO IÔNICOS – TRITON X-100 E TWEEN**

**80**

Segundo a Companhia Tecnológica de Saneamento Ambiental (CETESB), os surfactantes têm uma concentração dita segura no ambiente aquático. Contudo, a empresa diz que: “*O principal inconveniente dos detergentes na água se relaciona aos fatores estéticos, devido à formação de espuma em ambientes aeróbicos*” e não a toxicidade destes compostos para os organismos que entrarem em contato com ela. A concentração permitida pela CETESB é de 0,5 mg/L independente da classe de consumo à qual o rio se destina ([www.cetesb.com.br](http://www.cetesb.com.br)), no entanto em regiões próximas à favelas e indústrias esta concentração pode chegar a ser próximas a 0,3 g/L, acima da Concentração Micelar Crítica de muitos detergentes.

Os surfactantes são muito utilizados na área bioquímica para a extração de proteínas e na área de química analítica, mas também extensamente usados em produtos domésticos, na agricultura e na indústria alimentícia (le Maire et al., 2000, Berthod et al., 2001). Enquanto alguns deles, como o SDS (dodecil sulfato de sódio), podem solubilizar a membrana e desnaturar as proteínas, os surfactantes não-iônicos, como o Triton X-100 e o Tween 80, solubilizam a membrana, mas não desnaturam as proteínas (Jones, 1999; le Maire et al., 2000).



**Fig.6** – Estrutura dos xenobióticos estudados. (A) Trifluoperazina, (B) Triton X-100 e (C) Tween 80.

O Triton X-100 (polietoxietanol *t*-octilfenoxi) e o Tween 80 (Polioxietileno-sorbitol monooleato) (Fig.6B e 6C, respectivamente) são dois surfactantes não-iônicos, ou seja, em solução aquosa não se dissociam formando íons. Caracterizam-se por apresentar a porção hidrofílica formada por grupamentos de polioxietileno (PEG) e a porção hidrofóbica formada pela cabeça apolar (Attwood & Florence, 1983, Berthod et al., 2001).

Ambos são largamente utilizados nas indústrias alimentícias, em produtos domésticos e na agricultura (Berthod et al., 2001). Estudos demonstraram que tais surfactantes podem aumentar a permeabilidade do trato gastro-intestinal a substâncias tóxicas e com alto poder carcinogênico, como os barbituratos e derivados do enxofre. Além disso, podem diminuir a viscosidade do sangue e aumentar a liberação de histamina (Attwood & Florence, 1983, Jones, 1999, le Maire et al., 2000).

A maioria das pesquisas sobre os efeitos tóxicos dos surfactantes demonstrou a sua interação com membranas, em especial a membrana de eritrócitos (Banghan & Lea, 1978, Carafa et al., 1999, Galembeck et al., 1998, Ruggiero & Meirelles, 1998, Malheiros et al., 1998, Malheiros et al., 2000, Preté, 2000). No entanto, não há praticamente nenhum estudo que esclareça os efeitos de surfactantes no ciclo de reação do citocromo P450. Isto acontece porque os surfactantes são usados apenas nos processos de purificação deste citocromo (Omura e Sato, 1964a, Nakhgevany et al. 1996). As pesquisas existentes nesta área dizem respeito à ação de surfactantes usados na fabricação de espermicidas em P450 da mucosa vaginal e a algumas das conseqüências decorrentes da exposição do ser humano ao produto da degradação microbial destes surfactantes (Hosea & Guengerich 1998).

Outros estudos também demonstraram que em humanos os surfactantes podem ser oxidados pelo sistema P450. Estes compostos também podem causar a inibição do mecanismo catalítico, a solubilização do sistema e a conseqüente destruição do P450 quando em altas concentrações. Mudanças conformacionais do citocromo P450 e a alteração da atividade catalítica das enzimas associadas também já foram detectadas na presença de surfactantes em P450 de humanos (Yun et al., 1997, Guengerich et al., 1998, Hosea & Guengerich, 1998).

Estudar o efeito de detergentes em microssomas de peixes, bem como a ação de um xenobiótico qualquer sobre este sistema permitirá que sejam desenvolvidos modelos de biomarcadores de poluição ambiental e, no futuro através de modelos *"in vivo"*, comprovar se realmente as informações da CETESB são verdadeiras.

## **2 – OBJETIVOS**

- Purificação parcial e caracterização espectrofotométrica do P450 em *Prochilodus scrofa*
- Verificar o comportamento espectral dos componentes do sistema microsossomal hepático (SMH) de *Prochilodus scrofa*: citocromos P450, P420 e b5, enzimas NADPH-citocromo P450-redutase e Glutathione – S – Transferase e enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) frente à ação de três xenobióticos estruturalmente diferentes: Trifluoperazine, Triton X-100 e Tween-80 em função do tempo de incubação.
- Verificar a dependência dos processos de biotransformação dos três xenobióticos por cofatores e os seus efeitos no sistema.
- Verificar a interação dos xenobióticos com os componentes do SMH e sua interferência na ação do P450 e em enzimas associadas.
- Observar se os xenobióticos são capazes de gerar mudanças na estrutura e na carga total dos componentes do SMH.
- Identificar quais isoformas do P450 são induzidas pelos xenobióticos.
- Relacionar o efeito dos xenobióticos estudados com as enzimas antioxidantes (Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase) e correlaciona-los com os níveis de atividade do P450 nas mesmas situações.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - MATERIAL BIOLÓGICO**

Durante o período de fevereiro de 1997 e outubro de 2000 foram coletados 44 peixes Curimatá (*Prochilodus scrofa*, Pisces, Prochilodontidae), machos e fêmeas adultos no Centro de Treinamento em Aqüicultura (CEPTA/IBAMA) em Pirassununga, SP, Brasil. Os peixes eram criados em tanques especiais desprovidos de poluição e alimentados apenas com ração especial.

O tamanho médio dos peixes foi em torno de  $33,0 \pm 10,0$  cm e o peso médio entre  $4,5 \pm 1,0$  kg. Esta variação é dada pela diferença de sexo e de idade dos peixes coletados. Como *Prochilodus scrofa* não apresenta dimorfismo sexual externo, o sexo dos peixes coletados só era determinado quando o animal era aberto.

Em cada coleta foram capturados de 6-12 animais. Os peixes eram mortos por decapitação e tinham seus fígados lavados em solução salina para remover o excesso de sangue. Os microssomas foram preparados em "pools" de seis fígados.

#### **3.2 - PREPARAÇÃO DOS MICROSSOMAS**

Os fígados foram lavados com Tampão Fosfato de Potássio 0,1M e pH 7,5 preparado com 0,1M  $K_2HPO_4$  (dibásico) e 0,1M  $KH_2PO_4$  (monobásico); 0,15M de KCl e 1mM de EDTA (para evitar a peroxidação lipídica) e sempre mantidos no gelo durante a preparação para garantir a manutenção da integridade enzimática dos microssomas. As amostras de tecido foram cortadas e homogeneizadas no Potter Elvehjen por 15 segundos em uma razão 1:5 (v/v) de tampão gelado.

O homogeneizado foi submetido a uma centrifugação de 12.000 x g durante 20 minutos, da qual se retirou o sobrenadante que foi submetido a duas novas centrifugações de 105.000 x g durante 60 minutos (rotor Beckman Ti 80) que resultaram no isolamento das proteínas citossólicas no sobrenadante e as microssomais no pellet. O precipitado microssomal foi suspenso em Tampão Fosfato de Potássio 0,2M pH 7,5 com glicerol (mesma metodologia do tampão de lavagem, mas acrescido de 20% de glicerol para a conservação dos microssomas) em uma razão de 1:3 (v/v). As amostras foram colocadas em eppendorffs e armazenadas à - 70°C para que não houvesse perda da atividade enzimática (Vrolijk et al., 1994).

### 3.2.1 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração das proteínas foi determinada pelo método modificado de Lowry e colaboradores (1951) usando BSA (Soro Albumina Bovina) 1mg/ml como padrão. Os valores da concentração total de proteínas microssomais são expressos em mg/ml. As amostras foram lidas em triplicatas a 750 nm em um Espectrofotômetro Beckman DU70.

### 3.3 - CARACTERIZAÇÃO ESPECTRAL DOS CITOCROMOS b5, P420 E P450.

A suspensão microssomal foi diluída até uma concentração final de 1mg/ml para então acrescentarmos uma pequena quantidade de cristais de Ditionito de Sódio, o que permitiu a visualização do citocromo b5. Nesta situação a amostra foi lida contra uma solução de microssomas. A concentração deste citocromo foi obtida segundo a equação abaixo:

$$C_{b5} \text{ (mmoles/mg prot.)} = \text{Abs}^{424} - \text{Abs}^{413} / \epsilon^{424-413} / [\text{microssoma}],$$

onde

$$\varepsilon^{424-413} = 185\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$\text{Abs}^{424}$  = intensidade de absorvância em 424nm,

$\text{Abs}^{413}$  = intensidade de absorvância em 413nm,

[microssoma] = concentração de proteínas microssomais (em mg/ml)  
obtidas através do método de Lowry (1951).

Embora o citocromo b5 também possa ser reduzido utilizando-se NAD(P)H, optou-se em fazer sua redução com Ditionito de Sódio já que na quantificação do citocromo b5 utiliza-se preferencialmente este composto, padronizando, assim, o método de quantificação dos principais componentes do SMH.

Os citocromo P450 e P420 são identificados através da geração de um composto formado entre os microssomas reduzidos com Ditionito de Sódio e borbulhados com 50 $\mu$ l de Monóxido de Carbono (CO) na suspensão de microssomas 1mg/ml reduzidos com Ditionito de Sódio. Nesta situação a mistura de reação foi lida contra uma suspensão de microssomas 1mg/ml reduzidas com Ditionito de Sódio (Omura e Sato, 1964a; Omura & Sato, 1964b).

O método clássico de Omura & Sato (1964a) utiliza Ditionito de Sódio na redução do citocromo P450 para minimizar a interferência de hemoglobina no espectro final. Além disto o P450 é reduzido parcialmente na presença de NAD(P)H (10-30% a menos de P450 é reduzido na presença deste cofator quando comparado à redução com Ditionito de Sódio, segundo Matsubara e colaboradores (1976)). O NAD(P)H é um bom agente redutor apenas em condições anaeróbicas (Omura & Sato, 1964a). Este experimento permite a quantificação do citocromo P450 através da diferença espectral entre o complexo formado entre o P450 reduzido e ligado ao CO e o P450 reduzido. Assim quantificação do P450 e do P420 são feitas segundo as equações abaixo:

$$C_{P450} \text{ (mmoles/mg prot.)} = \text{Abs}^{450} - \text{Abs}^{490} / \epsilon^{450-490} / [\text{microssoma}],$$

onde

$$\epsilon^{450-490} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$\text{Abs}^{450}$  = intensidade de absorbância em 450nm,

$\text{Abs}^{490}$  = intensidade de absorbância em 490nm,

[microssoma] = concentração de proteínas microssomais (em mg/ml)  
obtidas através do método de Lowry e colaboradores (1951).

$$C_{P420} \text{ (mmoles/mg prot.)} = \text{Abs}^{420} - \text{Abs}^{490} / \epsilon^{420-490} / [\text{microssoma}],$$

onde

$$\epsilon^{420-490} = 111 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$\text{Abs}^{420}$  = intensidade de absorbância em 420nm,

$\text{Abs}^{490}$  = intensidade de absorbância em 490nm,

[microssoma] = concentração de proteínas microssomais (em mg/ml)  
obtidas através do método de Lowry e colaboradores (1951).

As medidas foram feitas em um Espectrofotômetro Beckman DU70 e/ou Hitachi 2010 em uma faixa de absorção de 400 - 700nm. Os ensaios foram realizados sempre a 23°C.

### 3.4 – METABOLISMO E INCUBAÇÃO DOS XENOBIÓTICOS

O metabolismo dos xenobióticos (Triton X-100; Tween 80 e Trifluoperazina) pelo sistema microssomal hepático foi monitorado através dos citocromos b5, P450 e P420.

A suspensão microsomal (1mg/ml) em um volume final de 10 ml foi incubada com ou sem Sistema Regenerador de NADPH por 20 minutos em banho-termostatizado a 23°C. No chamado T<sub>0</sub> (0 minuto de incubação) uma alíquota de 1ml era transferida para uma cubeta de quartzo de 1cm e a dosagem do citocromo de interesse era feita segundo o protocolo descrito no item 3.3. Após 3 minutos de incubação (T<sub>1</sub>) adicionava-se 0,1; 0,2 ou 0,5 mM de Trifluoperazina, Triton X-100 ou Tween 80. A suspensão era levemente agitada e uma nova alíquota de 1ml era retirada e a dosagem do citocromo de interesse era feita como já descrito. A cada 3 minutos uma nova alíquota era retirada da suspensão e a dosagem do citocromo realizada.

O Sistema Regenerador de NADPH era constituído de 10mM de Glicose-6-Fosfato; 1mM de NADP<sup>+</sup> e 0,5-1,0 U/ml de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (Fent & Bucheli, 1994). Neste sentido, portanto, foram feitos dois tipos controle: um com NADPH e o outro sem a presença deste cofator. As leituras foram feitas durante 20 minutos em temperatura de 23°C numa faixa de absorção de 400-700nm.

### **3.5 – CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DO SISTEMA MICROSSOMAL HEPÁTICO**

#### **3.5.1 – ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)**

A análise do perfil de massa molecular das proteínas foi feita segundo Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi preparado a 12,5% (proporção 30:0,8 de acrilamida:bisacrilamida). O gel de corrida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,4M pH 8,8, contendo, SDS 0,2%, PSA 0,025% (100 mg/mL) e TEMED 0,05%, em volume final de 8mL para cada gel. Após a polimerização do gel de corrida,

foi preparado o gel superior para a aplicação das amostras, usando-se acrilamida 3% em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, contendo 0,5% de SDS, 25 µl de PSA (100 mg/mL) e 0,1% de TEMED, em um volume final de 2 mL. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA).

As amostras (100µg/ml) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,08M pH 6,8 contendo 10% de glicerol, 0,02% de bromofenol e 2% de SDS. As amostras foram reduzidas com 6M de β-mercaptoetanol no mesmo tampão, aquecidas por 15 minutos a 100°C e, em seguida, aplicadas em volume máximo de 40µL. A corrida eletroforética foi desenvolvida em temperatura ambiente, em tampão Glicina/Tris-HCl 0,18M/0,025M, pH 8,3, contendo 0,1% (m/v) de SDS com duração aproximada de 2 horas sob voltagem constante de 60 mV para o gel de aplicação e 100 mV para o gel de corrida.

### **3.5.2 - ELETROFORESE EM CONDIÇÕES NATIVAS**

A análise das proteínas foi feita segundo Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi preparado sob 7,5% (proporção 30:0,8 de acrilamida:bisacrilamida). O gel de corrida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,4M pH 8,8, contendo, PSA 0,025% (100mg/mL) e TEMED 0,05%, em volume final de 8mL para cada gel. Após a polimerização do gel de corrida foi preparado o gel superior para a aplicação das amostras usando-se acrilamida 3% em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6, 8, 25µl de PSA 0,025% (100mg/mL) e 0,1% de TEMED, em um volume final de 2mL. A eletroforese foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA).

As amostras (100µg/ml) foram dissolvidas em 15 µL tampão Tris-HCl 0,08M pH 6,8, contendo 10 % de glicerol e 0,02% de bromofenol. A corrida eletroforética foi desenvolvida em temperatura ambiente, em tampão Glicina/Tris-HCl 0,18M/0,025M, pH 8,3, com duração aproximada de 9 horas e 30 minutos sob

voltagem constante de 60 mV para o gel de aplicação e 100 mV para o gel de corrida. Após 6 horas de corrida foi trocado o tampão Glicina/Tris-HCl 0,18M/0,025M, pH 8,3, por uma amostra mais nova para aumentar a força iônica

### **3.5.3 – COLORAÇÃO DO GEL – MÉTODO COOMASSIE BLUE R250**

Ambos os géis foram corados pelo método de Coomassie Blue R-250. Após a corrida, eles eram retirados das placas e colocados em uma solução contendo Coomassie Blue R-250 0,25% em metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v), para a coloração das proteínas. A descoloração dos géis, para a remoção do excesso de corante e visualização das bandas de proteínas, foi efetuada por lavagem na mistura de metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v).

### **3.6 – PURIFICAÇÃO PARCIAL DO CITOCROMO P450 ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA (VIA HPLC).**

A fração microssomal contendo o P450 foi analisada em coluna de fase reversa (HPLC). 200 µL de suspensão microssomal 9,98mg/ml foi ressuspenso em TFA 0,1 % (solvente A) e submetido a uma cromatografia em fase reversa em coluna µ-Boundapak C18 (3,9 x 30 cm) acoplada ao HPLC (Waters).

A coluna foi equilibrada em solução de TFA 0,1 % em água obtida por sistema MILLI Q (solvente A). A eluição foi realizada por gradiente de TFA em ACN (solvente B) sob fluxo constante de 2,0 ml / min de acordo com a Tabela 3. O material proveniente da C18 (HPLC) foi liofilizado para ser analisado em gel de poli(acrilamida) em condições desnaturantes.

Tab. 3 - Gradiente utilizado no HPLC para eluição do material aplicado à coluna de  $\mu$ -Bondapack C18.

Tempo (min)	Solvente A(%)	Solvente B(%)
5	100	0
20	50	50
40	30	70
45	25	75
55	0	100
60	0	100
61	100	0
70	100	0

### 3.7 – DOSAGEM DAS ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

#### 3.7.1 – ATIVIDADE DA NADPH-CITOCROMO P450-REDUTASE

A suspensão microsomal (1mg/ml) em um volume final de 1ml foi incubada por 20 minutos em banho-maria a 23°C. No chamado  $T_0$  (0 minuto de incubação) uma alíquota foi transferida para uma cubeta de quartzo de 1cm e a dosagem da enzima NADPH-citocromo P450 redutase foi feita segundo o protocolo descrito abaixo. Após 3 minutos de incubação ( $T_1$ ) 0,1; 0,2 ou 0,5 mM de Trifluoperazina, Triton X-100 ou Tween 80 era adicionado e a suspensão era, então, levemente agitada. Uma nova alíquota era retirada e a dosagem realizada como descrita a seguir. A cada 3 minutos uma nova alíquota era retirada da suspensão para a dosagem da enzima.

A atividade da enzima NADPH-citocromo P450 redutase foi medida segundo o método utilizado por Vrolijk e colaboradores (1994), alterando-se apenas a quantidade de proteínas microsomais para otimizar a reação. A mistura de reação continha 0,1M de tampão fosfato de potássio pH 8,5; 71 $\mu$ l de citocromo c (Sigma) e de 0,05 á 0,07mg de proteína microsomal, em um volume final de 1,0

ml. Esta solução é usada na calibração do aparelho. A reação inicia-se com a adição de NADPH (Sigma) (0,6 mM na concentração final) ou de Sistema Regenerador de NADPH (10mM Glicose-6-fosfato; 1mM NADP<sup>+</sup> e 0,5U/ml de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase).

Nesta situação o que estamos observando é o efeito dos xenobióticos na atividade da enzima NADPH citocromo P450 redutase em uma reação análoga a que ela realiza no ciclo do citocromo P450: a redução do citocromo c. A reação foi acompanhada pelo aumento do pico de absorção de 550nm, correspondente ao citocromo c reduzido (coeficiente de extinção molar de 21mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). Os experimentos foram realizados à temperatura de 23 -24 °C. As amostras foram lidas durante 20 minutos em intervalos de 3 minutos.

### **3.7.2 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE**

A suspensão microssomal (1mg/ml) em um volume final de 1,0 ml foi incubada por 20 minutos em banho-termostatizado a 23°C. Em chamado T<sub>0</sub> uma alíquota era transferida para uma cubeta de quartzo de 1cm e a dosagem da enzima Glutaciona-S-Transferase feita segundo o protocolo descrito abaixo. Após 3 minutos de incubação (T<sub>1</sub>) 0,1; 0,2 ou 0,5 mM de Trifluoperazina, Triton X-100 ou Tween 80 era adicionada à suspensão que era, então levemente agitada e uma nova alíquota era retirada para a dosagem da enzima. A cada 3 minutos uma nova alíquota era retirada da suspensão e a atividade da enzima dosada.

A atividade da Glutaciona-S-Transferase foi dosada pelo método utilizado por Vrolijk e colaboradores (1994), otimizando-se as misturas de reação. O ensaio era feito utilizando-se GSH 2mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1mM correspondente a 5% do volume final da mistura de reação; esta solução foi utilizada como “branco” do aparelho. A reação foi iniciada pela adição de 0,05 – 0,06 mg de proteína citossólica. A atividade foi medida pelo aumento da absorção em 340nm, correspondente ao CDNB (coeficiente de extinção molar de 9,6 mM<sup>-1</sup>

cm<sup>-1</sup>) em temperatura de 23°C. As amostras foram lidas a cada 3 minutos durante 20 minutos de incubação.

### **3.8 – DETECÇÃO DAS ISOFORMAS DO CITOCROMO P450 E OS EFEITOS CAUSADOS PELOS XENOBIÓTICOS ESTUDADOS EM CADA UMA DELAS.**

O metabolismo de diferentes derivados da resorufina, como a 7-etoxiresorufina e a 7-pentoxiresorufina é mediado por isoformas específicas do citocromo P450 presentes no intestino e no fígado de diferentes organismos. As reações catalisadas por estas enzimas são de O-desalquilação da etoxiresorufina e pentoxiresorufina através das enzimas Etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e Pentoxiresorufina-O-desetilase (PROD) respectivamente. Esta propriedade do P450 faz com que a medida das resorufinas sejam válidas para descrever quantitativa e qualitativamente a indução do sistema P450 por certos tipos de xenobióticos (Pohl & Foutts, 1980). A aparente especificidade das isoformas do citocromo P450 para estes substratos O-etils e a sensibilidade do método fluorimétrico tornam a atividade de desalquilação do P450 um método conveniente e alternativo na avaliação dos efeitos de diferentes xenobióticos na atividade detoxificante das isoformas citocromo P450 (Prough et al., 1978, Pohl & Fouts, 1980).

As isoformas analisadas foram as CYP1A, através da EROD, e a CYP2B através da PROD. A suspensão microssomal (1mg/ml) em um volume final de 10 ml foi incubada por 20 minutos em banho-termostatizado a 23°C. No chamado T<sub>0</sub> uma alíquota de 1ml era transferida para uma cubeta de fluorescência de 1cm e a dosagem da EROD e da PROD feitas segundo o protocolo descrito nos itens 3.8.1 e 3.8.2 respectivamente. Após 3 minutos de incubação (T<sub>1</sub>) 0,1; 0,2 ou 0,5 mM de Trifluoperazina, Triton X-100 ou Tween 80. A suspensão era

levemente agitada e uma nova alíquota de 1ml era retirada. A cada 3 minutos uma nova alíquota era retirada da suspensão e a dosagem realizada.

As análises foram feitas em regime de "repeated scan" em temperatura ambiente. Na primeira leitura (0 minuto) foi dosada a intensidade da fluorescência sem a presença da droga, que somente foi adicionada ao sistema após 3 minutos.

Tanto no ensaio da EROD quanto no da PROD ajustou-se o aparelho para comprimento de onda de excitação e emissão para a resorufina, o produto da reação, foram 530 e 580 nm, respectivamente. Os ensaios foram realizados em espectrofluorímetro Hitachi 4500.

### **3.8.1 – ETOXIRESORUFINA – O – DESETILASE**

O envolvimento da isoforma CYP1A na biotransformação dos xenobióticos estudados foi analisado através de alteração na intensidade da 7-etoxiresorufina em adaptação do método de Pohl & Fouts (1980). A mistura de reação continha 1 $\mu$ M de 7-etoxiresorufina, 0,1mg/ml de suspensão microssomal, sistema regenerador de NADPH (10mM de Glicose-6-Fosfato; 1mM de NADP<sup>+</sup> e 0,5-1,0 U/ml de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase) e Tampão Tris-HCl 0,1M pH7, 4 em um volume final de 1ml (Prough et al., 1978, Pohl & Fouts, 1980). Neste ensaio mede-se o aumento da intensidade da fluorescência em 580 nm, referente ao produto desta reação, a resorufina.

### **3.8.2 – PENTOXIRESORUFINA – O – DESETILASE**

O envolvimento da isoforma CYP2B no metabolismo da TFP, Triton X-100 e Tween 80 foi analisado através de mudanças na intensidade de fluorescência da 7-pentoxiresorufina em microssomas, adaptação ao método de Connor e colaboradores (1995). A mistura de reação continha 50  $\mu$ M de 7-pentoxiresorufina, 1 mg/ml de suspensão microssomal, 10mM de Glicose-6-

Fosfato, 1mM de NADP<sup>+</sup>, 0,5-1,0 U/ml de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase e completou-se o volume para 1 ml com Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7, 4 (Prough et al., 1978, Connor et al., 1995). Neste ensaio mede-se o aumento da intensidade da fluorescência em 580 nm, referente ao produto desta reação, a resorufina.

### **3.9 – DOSAGEM DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

A produção de espécies reativas do oxigênio nos microsomas de *Prochilodus scrofa* tratados com 0,1mM, 0,2mM ou 0,5mM dos xenobióticos estudados (TFP, Triton X-100 e Tween 80) foi determinada através da atividade das enzimas antioxidantes.

A suspensão microssomal foi diluída até a concentração de 1mg/ml e tratada com diferentes concentrações do xenobióticos e incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente (23-25°C). A cada 5 minutos, alíquotas desta suspensão eram retiradas e adicionadas à mistura de reação do ensaio de cada enzima para observar-se a linearidade da reação. Os experimentos foram realizados na ausência de SRNADPH devido à influência desse cofator nos comprimentos de absorção de luz utilizados nos ensaios. Os ensaios foram realizados em um espectrofotômetro Beckman DU-70 e Hitachi 2010.

#### **3.9.1 - SUPERÓXIDO DISMUTASE (EC 1.15.1.1)**

Os níveis de Superóxido Dismutase (SOD) foram determinados de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972) e Boveris e colaboradores (1983). O método se baseia na formação do adrenocromo (cromóforo rosa) durante a auto-oxidação da adrenalina promovida pelo ânion superóxido em meio alcalino. A reação tem início com a adição de 50µl de solução de adrenalina 60mM pH 2,0 em 1ml de tampão glicina 50mM pH 10,2. Acompanha-se a velocidade de formação espontânea do adrenocromo por 1 minuto em intervalos de 10

segundos. Alíquotas de 0,2mg/ml da suspensão de microssomas 1mg/ml, tratados ou não foram adicionadas à mistura de reação para avaliar o grau de inibição promovido pela enzima na formação do adrenocromo em 480 nm ( $\epsilon_{480} = 4,0 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por 1 minuto em intervalos de 5 segundos.

Curvas com 3 a 5 pontos foram obtidas para cada amostra e as atividades enzimáticas da SOD foram então determinadas indiretamente. Nestas condições, 1 unidade de SOD equivale a 50% de inibição que a enzima promove na velocidade de formação espontânea do adrenocromo (Flohé & Ötting, 1984). Os valores de SOD foram expressos em U/mg prot para facilitar a comparação entre os diferentes dados literários.

### **3.9.2 - CATALASE (EC 1.11.1.6)**

A atividade da Catalase (CAT) foi obtida pela sua capacidade de decompor o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser acompanhada diretamente pela diminuição da absorbância em 240 nm (Beers & Sizer, 1952; Aebi, 1984). A mistura de reação era composta por 10mM de peróxido de hidrogênio 30% (w/w) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é fundamental para o andamento do ensaio, já que a reação é de pseudoprimeira ordem. A esta solução foi adicionado 0,2mg/ml de suspensão microssomal, acompanhando-se o decréscimo da absorção por 1 minuto em intervalos de 10 segundos.

A atividade da CAT foi calculada segundo Lück (1965) baseado na diminuição da absorbância, segundo mostrado em (1):

$$k = (2,3/\Delta t) \log \text{Abs}_{\text{inicial}}/\text{Abs}_{\text{final}} \quad (1)$$

onde,

2,3 é o fator de conversão de ln para log.

$\text{Abs}_{\text{inicial}}$  é o valor da absorbância no tempo zero

$Abs_{final}$  é o valor da absorbância após 1 minuto de leitura

O valor de k é então convertido para unidades de catalase. Segundo Bergmeyer (1965) 1UB (Unidades Bergmeyer) é definida como a quantidade de catalase que libera a metade do oxigênio de uma solução de peróxido de hidrogênio de qualquer concentração no intervalo de tempo de 100 segundos. A equação de conversão de k para UB/ml é demonstrado em (2):

$$UBs = k / 0,693 \quad (2)$$

Os valores das atividades da CAT foram expressos em nmoles/mg prot. para fins de comparação com a literatura especializada; assim 1nmol de catalase equivale a 33UB (Wilhelm-Filho & Marcom, 1996).

### **3.9.3 - GLUTATIONA PEROXIDASE (EC 1.11.1.9)**

A atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx) foi monitorada através da taxa de consumo de NADPH em 340 nm (Flohé & Günzler, 1984). A reação acontece em pH fisiológico e foi iniciada pela adição de 3,4 mM de GSH em tampão fosfato 10mM pH 7, 5, NADPH 0,12mM, Glutaciona Redutase 0,24 U/ml (solução estoque 12 U/ml) e tert-butilhidroperóxido 10mM em um volume final de 1ml. Acompanha-se um decréscimo lento na absorbância por 1 minuto em intervalos de 10 segundos. A seguir adiciona-se uma alíquota de 0,1mg/ml da suspensão microssomal 1mg/ml, tratadas ou não com os xenobióticos, e observa-se um decréscimo acentuado na absorção por 2 minutos em intervalos de 10 segundos.

A diminuição nas concentrações de NADPH,  $\Delta[NADPH]/min$ , foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar apropriado, no caso  $6,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A taxa de reação da GPx é obtida através da diferença entre a reação não-enzimática (sem microssomas) e reação enzimática. Como a Glutaciona

(GSH) é regenerada continuamente pela Glutathiona Redutase, a concentração de GSH é mantida em seus níveis iniciais de 3,4 mM e deve ser levada em consideração durante os cálculos para que os resultados possam ser comparados com aqueles feitos em outros sistemas que não somente os dependentes de *tert*-butilhidroperóxido (Flohé & Günzler, 1984). Assim o consumo real do NADPH (mmoles/ml) foi calculado segundo descrito em (3):

$$A = 0,868(\Delta[\text{NADPH}]/[\text{GSH}]) (V_i/V_s) \quad (3)$$

Onde,

$\Delta[\text{NADPH}]$  é a diferença na concentração de NADPH entre a reação enzimática e não enzimática,

$[\text{GSH}]$  é a concentração (mM) de Glutathiona utilizada no ensaio,

$V_i$  é o volume final da mistura de reação,

$V_s$  é o volume de amostra utilizado.

O conteúdo de GPx foi expresso em pmoles/mg de proteína. Nestas condições 1pmol de GPx corresponde a 6 $\mu$ moles NADPH/ml (Marcon, 1996).

### **3.10 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA – (TBARS)**

Os níveis endógenos de peroxidação lipídica foram dosados indiretamente através dos produtos derivados da oxidação de lipídios com o ácido tiobarbitúrico (TBA) através do método espectrofotométrico adaptado de Ohkawa e colaboradores (1979) em 535 nm ( $\epsilon_{535} = 153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

As suspensões microsossomais foram diluídas até 0,5mg/ml em tampão fosfato 0,2 mM pH 7,4. Separou-se diversas alíquotas de 1ml desta suspensão que foram incubadas com 0,1mM, 0,2mM e 0,5mM de TFP, Triton X-100 ou

Tween 80 na presença e ausência de sistema regenerador de NADPH durante 20 minutos em temperatura ambiente (23-25°C). A seguir foi adicionado a esta suspensão 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) 25% para precipitar as proteínas microssomais. Retirou-se 1 ml do sobrenadante ao qual colocou-se 1ml de TBA (0,1g TBA/ 9ml NaCl 0,5 M). Esta mistura foi incubada durante 60 minutos em banho-maria a 100°C. Diversos autores já observaram que em tempos de incubação inferiores a este podem não permitir o desenvolvimento completo dos produtos do TBA, subestimando assim os valores reais de lipoperoxidação.

Após a incubação as amostras foram esfriadas e as absorbância correspondentes lidas em espectrofotômetro Beckman DU-70. As concentrações foram expressas em nmoles de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)/mg prot.

### **3.11 – DESLOCAMENTO DO PICO DE TRIPTOFANO**

A medida do deslocamento do pico de Triptofano (Trp), um dos principais aminoácidos que compõe o sítio ativo do citocromo P450, podendo indicar se está havendo alterações na conformação da proteína, levando à perda de sua atividade.

As suspensões microssomais foram diluídas até a concentração final de 1,0 – 1,5mg/ml em tampão PBS e incubadas por 20 minutos na ausência ou na presença de 0,1 mM, 0,2mM e 0,5mM dos xenobióticos estudados. As suspensões foram excitadas em 295nm em uma faixa de emissão de 305-580nm (Yun et al., 1997; Ruggiero & Meirelles, 1998).

### **3.12 – INTERAÇÃO ENTRE O CITOCROMO P450 E OS XENOBIÓTICOS**

Frações microsossomais contendo 0,5 mM de TFP, Triton X-100 ou Tween 80 foram incubadas durante 20 minutos e posteriormente analisadas em coluna de fase reversa (HPLC). 200 µL de suspensão microsossomal 7,98 mg/ml foi ressuspendido em TFA 0,1 % (solvente A) e submetido a uma cromatografia em fase reversa em coluna µ-Boundapak C18 (3,9 x 30 cm) acoplada ao HPLC (Waters).

A coluna foi equilibrada em solução de TFA 0,1 % em água obtida por sistema MILLI Q (solvente A). A eluição foi realizada por gradiente de TFA em ACN (solvente B) sob fluxo constante de 2,0 ml / min de acordo com a Tabela 3.

Comparou-se o perfil obtido nas frações microsossomais puras com aqueles obtidos para os diferentes xenobióticos estudados a fim de se observar possíveis interações entre os componentes do sistema microsossomal e os xenobióticos através de alterações na forma e na intensidade dos picos da amostra controle.

Controles foram feitos utilizando-se apenas a droga na concentração de 0,5 mM no mesmo padrão que as amostras anteriores. Estes controles são necessários devido à presença de anéis aromáticos na estrutura química dos xenobióticos estudados. Tais anéis absorvem em 280nm, podendo influenciar na interpretação dos dados.

### **3.13 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Todos os dados apresentados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média.

Os níveis de significância entre as amostras foram analisados segundo Análise de Multivariância (ANOVA), através do software GraphPad, utilizando-se como base  $p < 0,05$  (GraphPad Software, Inc., San Diego Califórnia USA). Correlações entre as diversas variáveis analisadas foram obtidas através do uso de análise de regressão linear, cuja significância foi considerada (Zar, 1996) (GraphPad Software, Inc., San Diego Califórnia USA).

## **4-RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA MICROSSOMAL HEPÁTICO (SMH) DE *Prochilodus scrofa*.**

O ambiente aquático é o ponto final de ação de muitos xenobióticos, fazendo com que peixes e outros organismos tenham um contato direto com estas substâncias. Devido à extrema toxicidade, tais compostos podem causar alterações no metabolismo do organismo, transformando-o em uma via de escoamento para estes xenobióticos (de Moraes et al., 1997, Williams et al., 1998).

Comparados aos mamíferos, os peixes apresentam um grande número de adaptações morfológicas e fisiológicas por habitarem diversos nichos do ambiente aquático (Wootton, 1992). Esta grande variabilidade faz com que o conteúdo de P450 em peixes que não foram submetidos a nenhum tipo de estresse físico ou químico varie entre as espécies, as linhagens, os sexos, a sazonalidade, a dieta, etc.

A Tabela 4 mostra a concentração de proteínas microsossomais e citossólicas de *P. scrofa*, bem como a concentração total dos principais componentes do SMH: citocromos b5 e P450. Os níveis de P450 em peixes parecem ser menores do que em mamíferos (Tab. 5). Outro dado importante é que em *Prochilodus scrofa* o conteúdo de P450 é cerca de 9 vezes maior do que o encontrado em outros teleósteos brasileiros de água doce com hábitos alimentares diferentes (Tab. 5). Comparado a teleósteos de água doce do hemisfério norte e com teleósteos marinhos esta diferença é de 10 e 3 vezes, respectivamente, maior em *P. scrofa* (Tab. 5). Estes dados mostram que o SMH se adapta ao modo de vida de cada animal, uma vez que entre todos os

organismos comparados na Tabela 5, *P. scrofa* é o único detritívoro e por isto estar mais susceptível à ação de compostos antropogênicos (Stegeman, 1989, Stegeman & Lech, 1991, Vrolijk et al., 1994, Degterev et al., 1999 e Leitão et al., 2000).

Tab. 4 – Concentração de proteínas de *Prochilodus scrofa* (Curimatá). Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. O número entre parênteses indica o número de amostras analisadas.

Proteínas	Concentração
Microsomal	10,08 $\pm$ 2,36 mg/ml (5)
Citossólica	8,907 $\pm$ 0,66 mg/ml (5)
b5	5,2531 $\pm$ 1,0422 nmoles/mg prot. (16)
P450	2,073 $\pm$ 0,416 nmoles/mg prot. (16)

Dosado segundo o método clássico de Omura & Sato (1964a), o conteúdo do SMH em *Prochilodus scrofa* apresenta algumas peculiaridades não relatadas ainda na literatura. A primeira diz respeito ao citocromo b5, uma heme proteína que age na oxidação de xenobióticos juntamente ao P450. Em *P. scrofa* o b5 apresentou um pico máximo de absorção entre 428–432nm quando reduzido com Ditionito de sódio; em mamíferos este máximo é apontado em torno de 424nm (Fig. 7A). Resultados similares foram obtidos com outros peixes neotropicais (*Hoplosternum littorale* – tamoatá; *Prochilodus nigricans* – curimatã; *Brycon cephalus* – matrinxã e *Colossoma macropomum* – tambaqui) e em tilápias (*Oreochromis niloticus*), um peixe introduzido. Todos estes organismos apresentaram um pico de 432nm quando reduzidos com Ditionito de sódio (Leitão et al., 2000). A redução destas amostras com NADH levou ao deslocamento do pico para 424nm. (Degterev et al., 1999, Leitão et al., 2000).

Tab. 5 – Comparação do conteúdo microssomal em diferentes espécies de peixes e em mamíferos

Espécie	b5 (nmoles/mg prot.).	P450 (nmoles/mg prot.).	Fonte
<i>Prochilodus scrofa</i> <sup>a</sup> (Curimbatá)	5,253±1,044	2,073±0,416	-
<i>C. macropomum</i> <sup>b</sup> (Tambaqui)	0,250± 0,075*	0,310±0,190	Leitão et al., 2000.
<i>B. cephalus</i> <sup>b</sup> (Matrinxã)	0,100±0,010*	0,230±0,130	Leitão et al., 2000.
<i>O. niloticus</i> <sup>c</sup> (Tilápia)	0,60±0,025*	0,160± 0,090	Leitão et al., 2000.
<i>Oncorhynchus mykiss</i> <sup>d</sup> (Tilápia)	0,018±0,004	0,295±0,105	Fent & Bucheli, 1994.
<i>Anguilla anguilla</i> <sup>e</sup> (Enguia)	0,037± 0,002	0,179±0,002	Fent & Bucheli, 1994.
<i>Cottus gobio</i> <sup>f</sup> ("Bullhead")	0,0047± 0,012	0,141±0,029	Fent & Bucheli, 1994.
<i>C. capistratus</i> <sup>g</sup> Ratos Fischer	nd	0,691±0,143	Vrolijk et al., 1994.
Camundongos Swiss	nd	1,66±0,12	Re et al., 1999.
	0,700±0,12*	0,920±0,200	Leitão et al., 2000.

\* Citocromo b5 determinado através da redução da amostra com NADH

Nd – não determinado

a – Peixe tropical brasileiro de água doce e detritívoro; b – peixe tropical brasileiro de água doce e frugívoros; c – peixe tropical introduzido no Brasil; d – peixe predador típico dos rios de altas altitudes Hemisfério Norte; e – Enguia europeia de água doce e predadora da cadeia alimentar bentônica; f – peixe europeu de água doce que vive no sedimento e é predador; g – teleósteo marinho, embora a espécie tenha sido encontrada no litoral da Flórida e de Belize, há exemplares no Brasil nas proximidades do litoral capixaba.

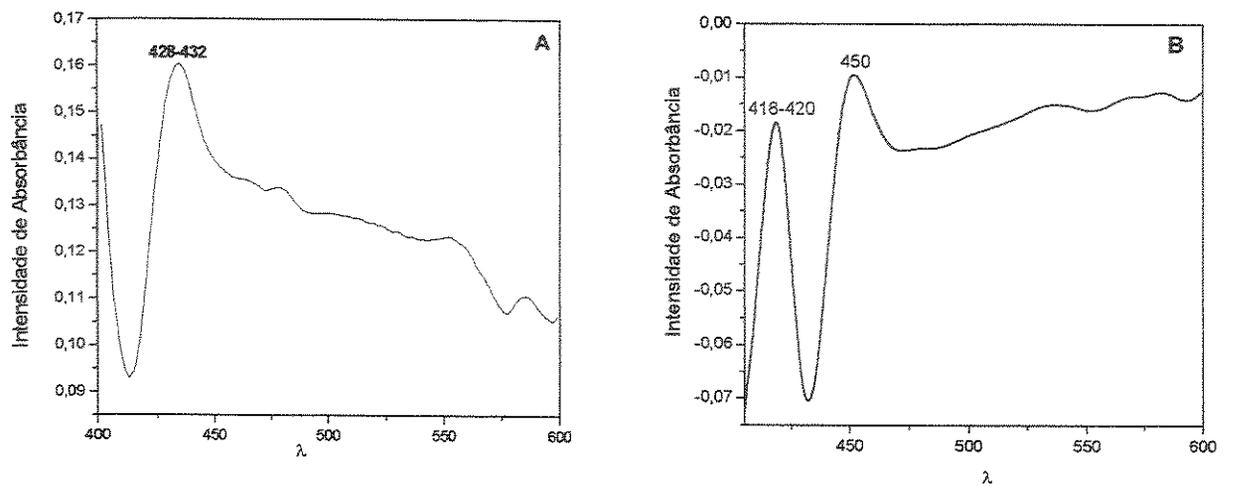


Fig. 7 – Características espectrais dos dois principais componentes do SMH de *Prochilodus scrofa*. (A) Citocromo b5 e (B) Citocromo P450 em suspensões microsossomais 1mg/ml reduzidas. Os citocromos foram identificados segundo o método de Omura e Sato (1964a).

A presença deste pico em 432nm pode indicar uma possível contaminação da amostra com hemoglobina, já que a preparação dos microsossomas de *Prochilodus scrofa* não incluiu a perfusão dos fígados com heparina. Nesta situação, a redução da hemoglobina com Ditionito de sódio forma a desoxi-hemoglobina, cujo pico de absorção é em 432nm, correspondente ao chamado pico de Soret, sobreposto ao pico de 424nm do citocromo b5. No entanto, em projetos paralelos realizamos experimentos com microsossomas de fígados perfundidos de diferentes peixes brasileiros, dentre eles *Prochilodus scrofa*, encontramos espectros diferenciais com Ditionito de sódio com um pico menor em 556nm e um pico principal variando entre 426-432nm, ambos correspondentes ao citocromo b5 (Leitão et al., 2000). Esta contaminação foi observada em quatro espécies de peixes tropicais, mas nunca foi relatada para peixes de outros continentes, o que levanta especulações sobre a natureza deste fenômeno.

O citocromo P450 também apresentou uma peculiaridade: a presença de um pico de 418-420nm junto ao pico clássico do citocromo em 450nm (Fig. 7B).

Tal evidência reforça a hipótese da contaminação das amostras por hemoglobina, já que a adição de CO nas amostras de microssomas levaria a formação da hemoglobina carbonilada, cujo máximo de absorção é em 418-420nm. Em projetos paralelos realizados, novamente, neste laboratório (Leitão et al., 2000) demonstramos que a adição do Ditionito de sódio formaria primeiro a desoxi-hemoglobina que seria posteriormente carbonilada pela presença de CO na suspensão gerando um perfil espectral onde o pico de 418-420nm poderia estar encobrindo o pico de Soret do citocromo P450, confirmando, portanto, que em microssomas frescos haveria altas concentrações de oxi-hemoglobina.

A contaminação microssomal por hemoglobina não aparece relatada para peixes na bibliografia analisada, embora este seja um evento comum em anelídeos, em especial os oligoquetas que possuem a chamada “hemoglobina gigante” cuja afinidade com o citocromo P450 é muito grande (Achazi et al., 1998, Saint-Denis et al., 1999). Em peixes a hemoglobina também se liga com muita afinidade aos tecidos, mas novamente os experimentos por nós realizados (Leitão et al., 2000) com fígados perfundidos, alteração do meio de homogeneização e mudanças nas taxas de ultracentrifugação, não apontaram nenhuma alteração significativa no espectro: o pico de 418-420nm continua aparecendo concomitante ao pico de 450nm, sugerindo que a contaminação por hemoglobina, embora forte, não é responsável pelas alterações no espectro clássico de P450.

No entanto, é possível que este pico em 420nm esteja relacionado à desnaturação do citocromo P450, cujo produto absorve na faixa de 418-420 nm (Omura & Sato, 1964a, Omura & Sato, 1964b). Espectros similares a estes foram detectados em moluscos do gênero *Mytilus* (*Mytilus galloprovincialis* e *Mytilus edulis* L.) (Gilewicz et al., 1984, Livingstone et al., 1989), em anêmonas do mar (Heffernan & Winston, 1998), em crustáceos (James, 1989) e em outros peixes brasileiros (Leitão et al., 2000). No caso dos invertebrados a presença deste pico está relacionada à presença de hepatopâncreas que durante a homogeneização libera enzimas proteolíticas responsáveis pela desnaturação do citocromo.

Contudo *Prochilodus scrofa*, assim como outros peixes brasileiros, é desprovido de hepatopâncreas, o que descarta a presença de substâncias desnaturantes, como enzimas proteolíticas responsáveis pela alteração do ambiente lipídico da membrana, levando ao surgimento do pico de 418-420nm pela desnaturação do P450 (Omura & Sato, 1964a).

A variação do P450 é dependente da idade, do sexo e da sazonalidade e já foi descrita para diferentes animais aquáticos, dentre os quais peixes e moluscos de diferentes espécies. Livingstone e colaboradores (1989) atribuíram a presença deste pico a variações sazonais e à exposição do organismo a um xenobiótico. Neste caso o pico de 418-420nm, por ele chamado de "P420", seria uma heme proteína de natureza desconhecida (Coon et al., 1992, Benhardt, 1995, Eggens et al., 1995, Eggens et al., 1996, Lochmiller et al., 1999).

Nesta mesma direção nossos estudos demonstraram que tilápias coletadas em locais poluídos não apresentaram o pico em 420nm (Leitão et al., 2000), reforçando a hipótese de Livingstone e colaboradores (1989) a respeito de uma provável natureza heme proteica deste pico. Com base nestes dados, é possível inferir que *Prochilodus scrofa* também apresenta uma heme proteína de natureza desconhecida, mas com características espectrais semelhantes ao P450, cujos níveis podem ser controlados por variações sazonais, sexo e a presença de xenobióticos.

#### **4.2 - PURIFICAÇÃO DO CITOCROMO P450 DE *Prochilodus scrofa***

O sistema microssomal é composto de diversas proteínas com diferentes massas moleculares (Fig.8) demonstrando que, embora o citocromo P450 seja o componente mais abundante, o sistema também é composto por

enzimas envolvidas em outros processos fisiológicos, como a síntese de triglicerídeos e o redirecionamento de proteínas de membranas (Hird et al., 1964, Alberts et al., 1994, Timbrell, 2000).

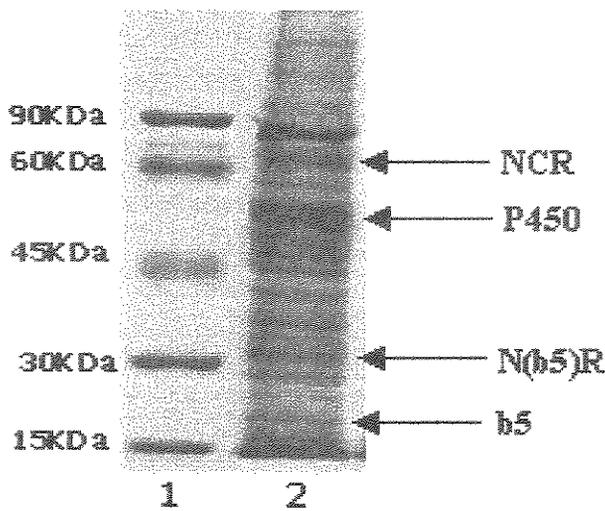


Fig. 8 – SDS – Page da fração microssomal hepática de *Prochilodus scrofa* antes da purificação. 1 – Marcadores de massa molecular e 2 – suspensão microssomal 100 $\mu$ g/ml. A seta indica a posição dos citocromos P450 (~54.000Da) e b5 (~16.000Da), da NADPH-citocromo P450 redutase – NCR (~76.000Da) e da NADH-citocromo b5 redutase – N(b5)R (~33.000Da).

Segundo a literatura, o citocromo P450 tem uma massa molecular em torno de 50.000-54.000Da. Em peixes esta variação pode chegar até 58.000Da devido à presença de isoformas funcionalmente diferentes das de mamíferos (Welton & Aust, 1974, Haugen et al., 1975, Guengerich, 1977, Nakhgevan, 1996).

A maioria das proteínas do retículo endoplasmático liso possui uma porção hidrofóbica responsável por seu ancoramento na membrana. Esta característica permite a separação destas proteínas através de uma coluna de hidrofobicidade acompanhando-se a absorção em 280 nm (para proteínas em geral) e 417 nm (para hemeoproteínas) concomitantemente. O perfil obtido pela

purificação confirma que o sistema microsomal hepático é composto por diversas proteínas (Fig. 9A), no entanto há apenas duas hemeoproteínas (Fig. 9B). Somente uma das frações coletadas apresentou massa molecular ao redor de 54.000Da, referente ao citocromo P450 (Fig. 9C). Para uma caracterização mais precisa do sistema esta fração coletada aos 48-50 minutos e com peso molecular ao redor de 54.000Da foi submetida à análise espectrofotométrica, confirmando ser o citocromo P450 (Fig. 9D).

Muitos autores purificam o P450 através da eletro-eluição do gel de poliacrilamida, mas esta técnica só é viável em animais cujos níveis de P450 são altos após a ativação. Infelizmente em nossos ensaios os níveis de P450 são baixos levando à necessidade do uso de técnicas mais sensíveis e capazes de separar proteínas em baixas concentrações.

Outros processos de purificação do citocromo P450 envolvem o uso de colunas de afinidade e de exclusão molecular em sistema de baixa precisão (LPLC). O processo proposto por nós utiliza apenas a coluna de hidrofobicidade acoplada a um sistema de alta precisão (HPLC), tornando o processo de purificação mais rápido e separando os componentes da suspensão microsomal segundo a hidrofobicidade. Outra vantagem do método de purificação via HPLC é não usar detergentes não-iônicos nos processos de eluição da coluna, uma vez que esta classe de surfactantes pode se ligar fortemente ao sítio ativo do P450 levando à sua destruição. A presença de detergentes nos processos de eluição também pode diminuir a resolução cromatográfica da coluna e, conseqüentemente, afetar a sensibilidade do método (Ross, 1996).

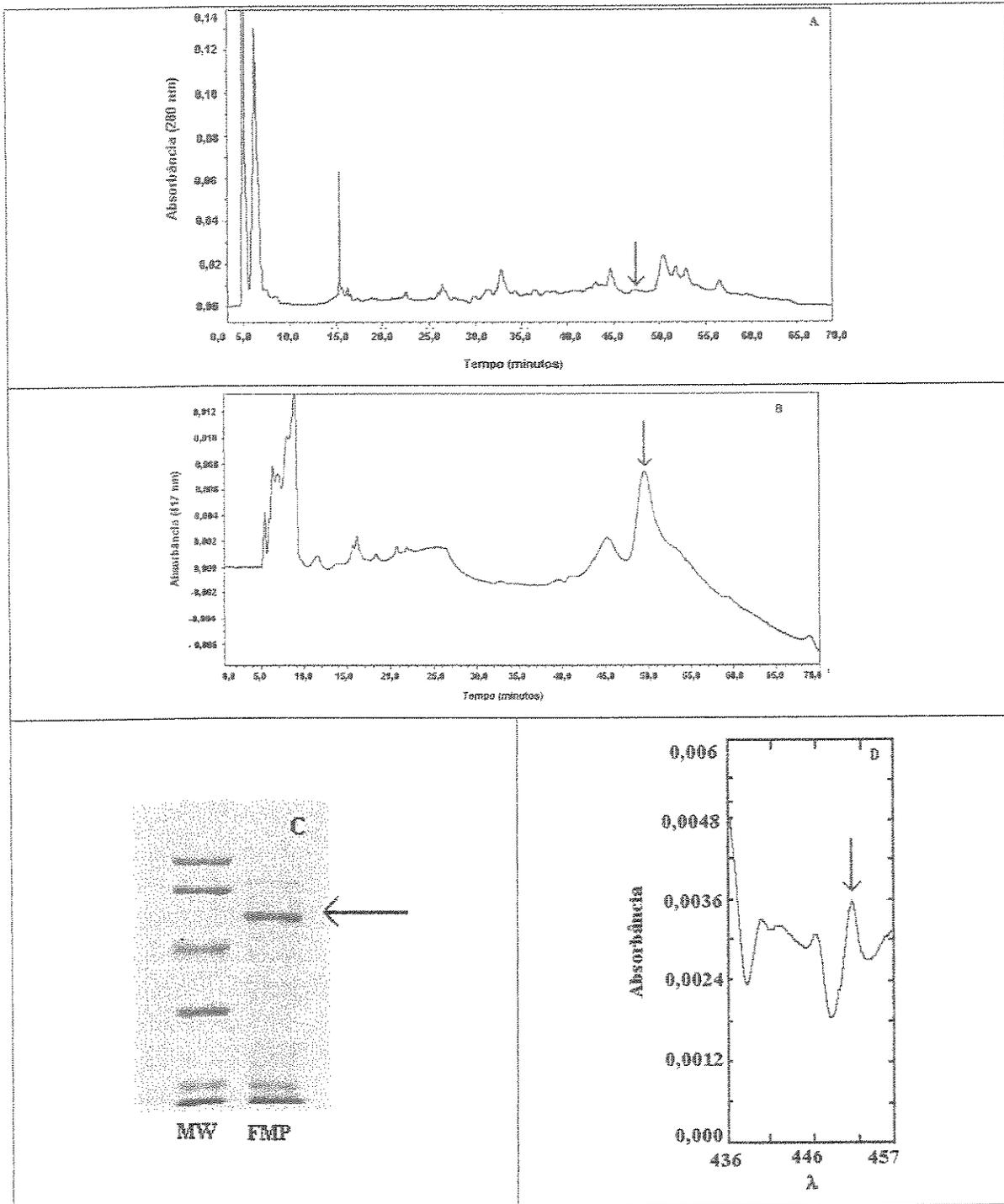


Fig. 9 – Purificação da forma hepática do citocromo P450 de *Prochilodus scrofa*. (A) Perfil hidrofóbico em 280 nm, (B) Perfil hidrofóbico em 417 nm, (C) Caracterização eletroforética e (D) Caracterização espectrofotométrica. As setas indicam a posição do citocromo P450 (54.000Da) em cada passo da caracterização. (MW) marcadores de massa molecular, (FMP) Fração Microsomal Purificada.

No entanto, o método de HPLC também tem suas desvantagens. Uma delas é a junção de isoformas na mesma fração impedindo sua identificação quando estão presentes em baixas concentrações (Ross, 1996). Uma sugestão para a otimização destes resultados e, conseqüentemente, a separação das isoformas seria a reaplicação da fração identificada como sendo o citocromo P450 com a concomitante alteração do gradiente de eluição possibilitando a separação das diferentes isoformas.

Além disto, a purificação por HPLC requer um pré-fracionamento da amostra para a precipitação das proteínas. Em nossos ensaios este passo foi excluído fazendo com que as frações coletadas apresentassem uma pequena quantidade de fosfolipídios da membrana microssomal, o que permitiu a identificação do P450 segundo o método de Omura & Sato (1964a). O conteúdo de P450 identificado através do método espectrofotométrico (CO-Complexo) revelou uma baixa concentração deste citocromo na sua forma ativa. Os baixos valores encontrados para o P450 após o processo de purificação podem ser explicados por uma possível perda do grupamento heme durante a eluição com acetonitrila. Este solvente retiraria o citocromo P450 do ambiente lipídico, subestimando, portanto, o valor real purificado (Omura & Sato, 1964a, Ross, 1996).

A purificação do citocromo P450 por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) através de uma coluna de hidrofobicidade pode ser uma importante ferramenta para a identificação de inúmeras formas do citocromo P450. O uso de colunas de hidrofobicidade já foi descrito em trabalhos anteriores, mas sempre como um segundo passo cromatográfico. A utilização da C18-HPLC se mostrou um método rápido e capaz de purificar o citocromo P450 em apenas um passo cromatográfico e, provavelmente, poderá ser aplicada para a purificação do citocromo P450 de outras espécies de peixes.

## **4.3 – BIOTRANSFORMAÇÃO DOS XENOBIÓTICOS**

### **4.3.1 – CITOCROMOS b5, P450 E P420.**

O primeiro passo no estudo de biomarcadores de poluição é a caracterização do sistema microssomal hepático. Nesta fase o uso de testes “*in vitro*” é essencial para se avaliar a capacidade de biotransformação do sistema utilizando concentrações maiores do que aquelas utilizadas no ambiente. Isto permite testar a sensibilidade e o comportamento do sistema em diferentes condições experimentais. A duração e a intensidade da ação do xenobiótico em sistemas biológicos são determinadas pela sua taxa de biotransformação. A inibição e/ou destruição do P450 pode levar ao prolongamento da ação do xenobiótico, aumentando a toxicidade deste e afetando funções fisiológicas importantes como a biossíntese de hormônios (Fent & Stegeman, 1991, Fent & Bucheli, 1994, Soucek et al., 1994, Dwivedi et al., 1998).

A fim de avaliar o sistema P450 e enzimas associadas em *Prochilodus scrofa* foram escolhidos três xenobióticos, a Trifluoperazina, o Triton X-100 e o Tween 80. Todos apresentam características surfactantes, ou seja, um caráter altamente lipofílico que os leva a interagir tanto com membranas como com proteínas. O efeito deletério dos surfactantes já vem sendo estudado em peixes há muito tempo, mas eles enfocam principalmente as brânquias e a epiderme, já que estes são os primeiros alvos dos xenobióticos (Sandbacka et al., 2000).

No processo de biotransformação de xenobióticos, o primeiro parâmetro analisado foi relativo as mudanças ocorridas no “conteúdo” do citocromo b5 na presença e na ausência de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH).

Na Tabela 6 observa-se que em T<sub>1</sub> há um aumento no conteúdo do citocromo b5 na presença de TFP quando o meio é incubado com Sistema Regenerador de NADPH. Comparando as suspensões tratadas com as mesmas

concentrações de TFP, na ausência e na presença de SRNADPH, vê-se que as diferenças são estatisticamente significantes, indicando que o cofator se comporta como um agente limitante nas taxas de biotransformação. Após 20 minutos de incubação (Tab. 7) a dependência do cofator não fica tão evidente ( $p > 0,05$ ), mas ainda é possível observar o aumento do “conteúdo” do citocromo em relação ao controle nas amostras com SRNADPH.

Tab. 6 – Efeito da TFP nas concentrações dos citocromos b5, P450 e “P420” após a adição da droga. As concentrações dos citocromos (nmoles/mg prot.) foram determinadas logo após a adição de TFP (3min) na presença (+) e ausência (-) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH) em suspensões microssomais de *Prochilodus scrofa* (1mg/ml). As amostras foram feitas em triplicatas. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. O número entre parênteses indica a quantidade de amostras foram analisadas. Controle: suspensão microssomal na ausência de xenobiótico.

Citocromo	Trifluoperazina (mM)			
	0,0	0,1	0,2	0,5
b5 (-)	3,2579 $\pm$ 0,0651 (2)	1,8794 $\pm$ 0,5050* <sup>a</sup> (12)	2,1054 $\pm$ 0,3528** <sup>a</sup> (10)	1,2252 $\pm$ 0,4025*** <sup>a</sup> (9)
b5 (+)	3,1054 $\pm$ 0,6383 (3)	3,7913 $\pm$ 0,1848 <sup>a</sup> (3)	3,9809 $\pm$ 0,2407 <sup>a</sup> (3)	5,2302 $\pm$ 0,4712 <sup>a</sup> (3)
P450 (-)	1,8718 $\pm$ 2,828 (2)	5,3469 $\pm$ 1,5556** <sup>b</sup> (8)	8,1403 $\pm$ 0,8600*** <sup>a</sup> (8)	4,5695 $\pm$ 0,8770 (5)
P450(+)	0,9414 $\pm$ 0,2121 (2)	1,9783 $\pm$ 0,5196 <sup>b</sup> (3)	3,7951 $\pm$ 0,5033 <sup>a</sup> (3)	2,6926 $\pm$ 0,0577 (3)
P420 (-)	2,7306 $\pm$ 0,03189 (2)	3,3938 $\pm$ 0,5344 <sup>b</sup> (9)	3,1738 $\pm$ 0,5525 <sup>b</sup> (9)	1,1057 $\pm$ 0,5972 ** (4)
P420 (+)	1,2728 $\pm$ 0,2425 (2)	2,0010 $\pm$ 0,1178 <sup>b</sup> (3)	1,6519 $\pm$ 0,2123 <sup>b</sup> (3)	1,125 $\pm$ 0,1812 (3)

\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle

<sup>a</sup>  $p < 0,001$  e <sup>b</sup>  $p < 0,01$  em relação à presença e ausência de SRNADPH

Tab.7 – Efeito da TFP nas concentrações dos citocromos b5, P450 e “P420” após 20 minutos de incubação. As concentrações dos citocromo b5, P450 e P420 (nmoles/mg prot.) foram determinadas após 20 minutos de incubação com TFP na presença (+) e ausência (-) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH) em suspensões microsomais de *Prochilodus scrofa* (1mg/ml). As amostras foram feitas em triplicatas. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. O número entre parênteses indica quantas amostras foram analisadas.

Citocromo	Trifluoperazina (mM)			
	0,0	0,1mM	0,2mM	0,5mM
b5 (-)	4,3059 $\pm$ 0,1225 (2)	3,7485 $\pm$ 0,8465 (12)	3,9991 $\pm$ 0,7443 (10)	2,6232 $\pm$ 0,4445 <sup>a</sup> (9)
b5 (+)	3,3453 $\pm$ 0,6456 (3)	5,1635 $\pm$ 0,4847 <sup>*</sup> (3)	5,4559 $\pm$ 0,1801 <sup>*</sup> (3)	6,2052 $\pm$ 0,9528 <sup>a</sup> (3)
P450 (-)	1,0020 $\pm$ 3,270 (2)	2,3775 $\pm$ 7,576 <sup>a</sup> (8)	1,8729 $\pm$ 7,017 <sup>b</sup> (8)	0,000 $\pm$ 0,000 (5)
P450(+)	0,1431 $\pm$ 0,0155 (2)	0,0605 $\pm$ 0,0318 <sup>a</sup> (3)	0,2789 $\pm$ 0,0554 <sup>b</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000 (3)
P420 (-)	2,6449 $\pm$ 0,06385 (2)	2,5107 $\pm$ 0,6094 (9)	2,2103 $\pm$ 0,5663 (9)	1,3389 $\pm$ 0,5540 (4)
P420 (+)	1,3315 $\pm$ 0,1596 (2)	1,5546 $\pm$ 0,06087 (3)	1,5483 $\pm$ 0,2191 (3)	1,3306 $\pm$ 0,08797 (3)

\* p<0,05 em relação ao controle

<sup>a</sup> p<0,001 e <sup>b</sup> p<0,01 em relação à presença e ausência de SRNADPH

Analisando o comportamento do citocromo b5 na ausência do cofator ao longo de 20 minutos observa-se que suas concentrações são sempre menores que as do controle (Fig.10A). Esta situação é invertida quando as suspensões são incubadas com o SRNADPH. Aqui o aumento do conteúdo do citocromo b5 é proporcional ao aumento das concentrações de TFP (Fig. 10B). Estes dados mostram a necessidade de um cofator exógeno nos processos de biotransformação.

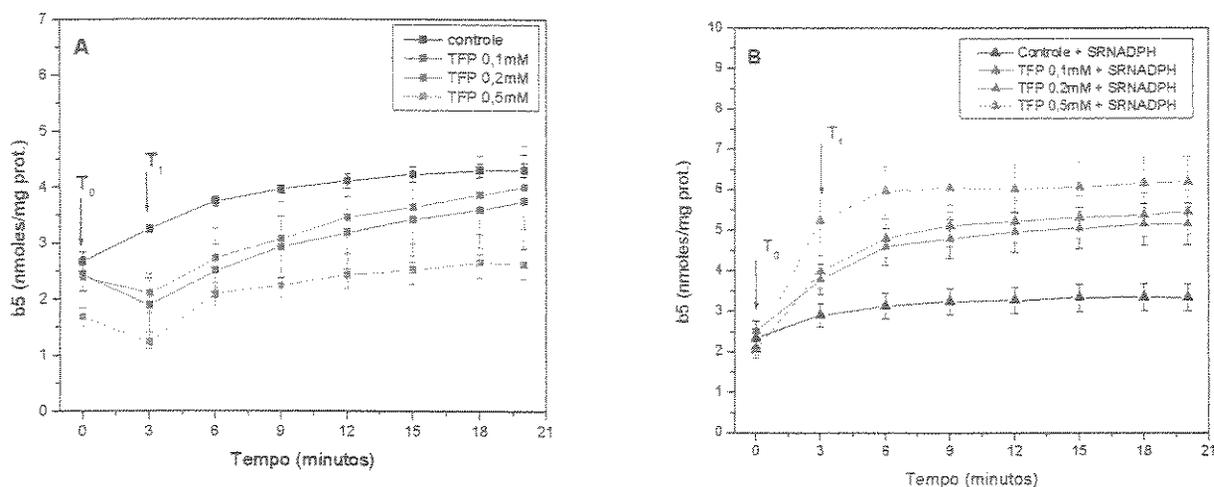


Fig. 10 – Efeito da Trifluoperazina no conteúdo do citocromo b5. O conteúdo do citocromo b5 em suspensão microssomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Trifluoperazina (TFP) foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todo o experimento foi realizado à 23°C.

Estudos anteriores demonstraram que outros derivados de fenotiazínicos como a Chloracizina e a Ftoricizina não alteraram o conteúdo do citocromo b5, indicando que o sistema P450 não estaria envolvido na metabolização da droga (Avakumov et al., 1978). No entanto, os experimentos realizados com TFP demonstraram um aumento pouco significativo no conteúdo do citocromo b5, contradizendo assim a hipótese acima descrita e sugerindo a participação do P450 no processo de biotransformação deste xenobiótico.

A biotransformação da TFP pelo citocromo P450 também é dependente da presença de cofator, como demonstrado nas Tabelas 6 e 7. As amostras com e sem SRNADPH apresentaram um aumento do conteúdo do citocromo P450 ativo quando o xenobiótico foi adicionado à suspensão microssomal (Fig.11). Ao final de 20 minutos de incubação o conteúdo de P450 diminuiu drasticamente, chegando a zero nas concentrações mais elevadas de TFP.

Os valores estatisticamente significantes encontrados com as dosagens usando o método clássico de Omura & Sato (1962a) não permite dizer qual o mecanismo de ação da Trifluoperazina. No entanto podemos inferir que o P450 existe na suspensão microsossomal em uma mistura de complexos hexacoordenados baixo-spin (Fe III), onde na posição trans há uma molécula de água ligada a cisteína e uma penta-coordenada alto-spin (Fe III), onde há apenas a cisteína como ligante. Deve haver, portanto, uma possível interação da TFP com o P450 deslocando o equilíbrio de oxi-redução entre os dois estados de Fe (III) que não é uma espécie muito reativa devido à presença da cisteína como ligante, para o do complexo penta-coordenado (Fe II) de alto spin, uma espécie mais reativa e hábil em se ligar a diversos substratos (Mansuy, 1998).

Após 6 minutos de incubação há diminuição drástica do conteúdo de P450. Contrariamente ao que ocorre em processos "*in vivo*", no sistema "*in vitro*" esta diminuição é mais rápida e drástica devido à ausência do processo de indução (Guengerich, 1997). O mecanismo de inibição mais conhecido na literatura é o da "ação suicida" e está ligado ao tipo de substrato a ser metabolizado pelo citocromo. Normalmente esta diminuição do conteúdo é dependente do tempo e está ligada às alterações no grupo prostético do citocromo causado pela ligação do xenobiótico e/ou seu metabólito aos resíduos de cisteína e histidina próximos do sítio catalítico do P450 (de Montellano & Correia, 1983, Halpert, 1995, Murray, 1992, Guengerich, 1997).

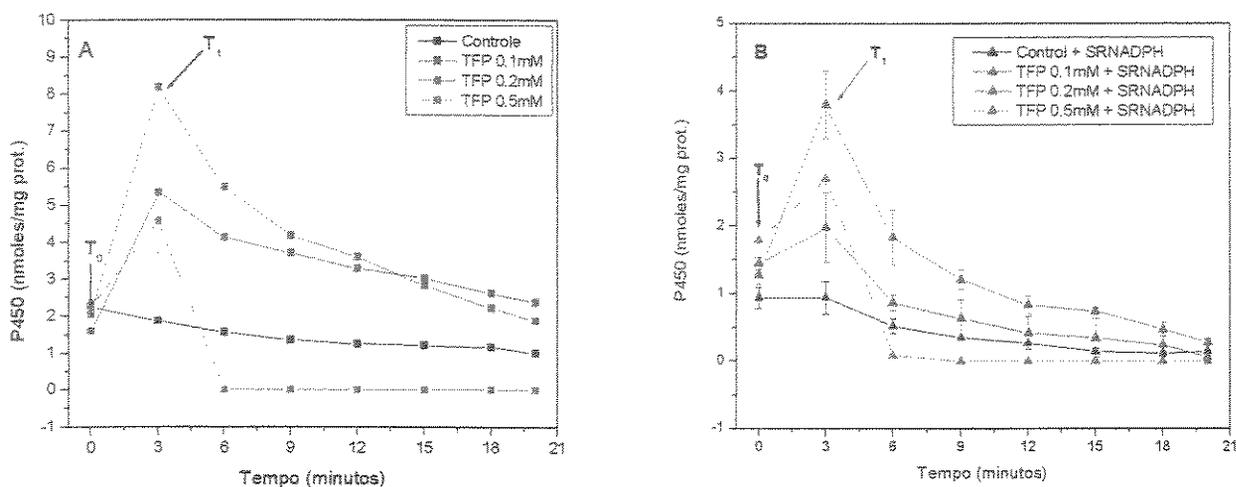


Fig. 11 - Efeito da Trifluoperazina no conteúdo do citocromo P450. O conteúdo do citocromo P450 em suspensão microsomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Trifluoperazina (TFP) foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todo o experimento foi realizado à 23°C.

A destruição do P450 é confirmada através do gel de SDS (Fig.12A), onde podemos observar uma diminuição na intensidade da banda à medida que se aumenta a concentração do xenobiótico. O perfil obtido por HPLC em C18 de microsomas tratados com TFP também demonstra a diminuição do pico referente ao P450 (Fig.12B), confirmando a sua destruição. A diminuição dos picos referentes à TFP (Fig.12B I e II) indica que parte do xenobiótico está sendo metabolizada, sustentando a hipótese de que algumas isoformas podem estar participando da metabolização do composto. Outra evidência que sustenta esta hipótese é mostrada na Figura 12C. Em alguns casos o produto da reação do P450, neste caso o metabólito nitroso oriundo da metabolização da TFP, pode interagir com os aminoácidos localizados próximos ao sítio catalítico do P450 formando um complexo P450-TFPNO que desloca a absorvância máxima do P450 para 455 - 456nm (Mansuy et al., 1976, Guengerich, 1997).

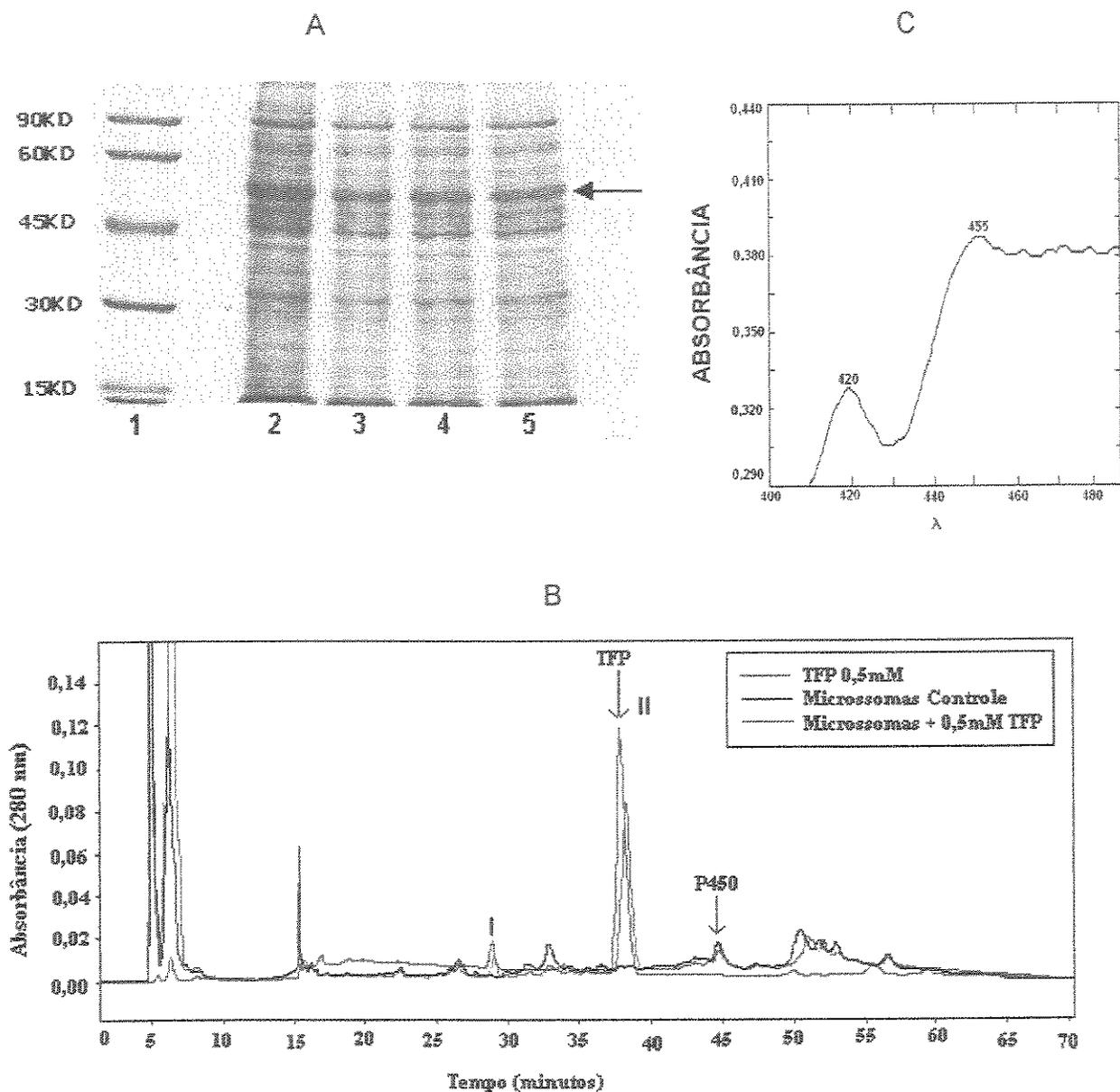


Fig. 12 – Interação entre a TFP e os componentes do Sistema Microsomal Hepático. (A) SDS – Page de microsomas 10,08 mg/ml tratados com diferentes concentrações de Trifluoperazina. (1) Marcadores de massa molecular, (2) Controle, (3) TFP 0,1mM, (4) TFP 0,2mM e (5) TFP 0,5mM. (B) Perfil da interação dos microsomas com 0,5mM de TFP através do HPLC. As setas indicam a posição do citocromo P450 (54.000Da), I e II são os picos referentes a Trifluoperazina. (C) Espectro do complexo formado entre o P450 e a TFP após 20 minutos de incubação da suspensão microsomal 1mg/ml com 0,5mM de TFP; o pico em 455 nm representa a interação entre a TFP e o P450.

Em pH 7,4 a TFP encontra-se na forma protonada (TFP+) e com pequenas frações na forma neutra (TFP:) (Malheiros et al., 2000), além disto este xenobiótico apresenta uma alta afinidade pelo ambiente lipídico da membrana

microssomal devido ao seu altíssimo coeficiente de partição (Malheiros et al., 1998). Esta característica permite a TFP interagir com as proteínas da membrana e expor os resíduos de triptofano destas a um ambiente mais hidrofílico. Esta é uma ligação forte e pode provocar mudanças na carga da proteína e a conseqüente perda da função (Attwood & Florence, 1983, de Montillano & Correia, 1983, Murray, 1992, Halpert, 1995, Ruggiero & Meirelles, 1998).

A TFP fez com que as concentrações de “P420” diminuíssem ou permanecessem inalteradas na presença e na ausência de SRNADPH (Fig. 13). Se o pico de 420nm representasse a forma desnaturada do citocromo P450 seria esperado um aumento das concentrações do P420 concomitante às diminuições do P450, o que não foi observado nos experimentos realizados. É um resultado interessante que sustenta a hipótese de que o P420 seria uma outra heme proteína do SMH (Omura & Sato, 1964a, Omura & Sato, 1964b, Fent & Stegeman, 1991, Fent & Bucheli, 1994, Leitão et al., 2000).

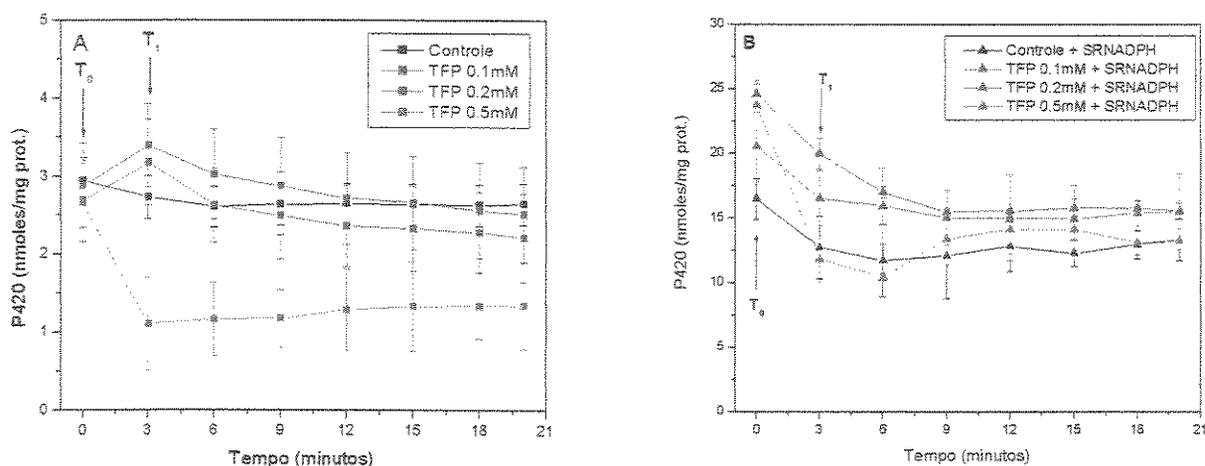


Fig. 13 - Efeito da Trifluoperazina no conteúdo do citocromo “P420”. O conteúdo do citocromo “P420” em suspensão microssomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Trifluoperazina (TFP) foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todos os experimentos foram realizados a 23°C.

Os fenotiazínicos são compostos nitroheterocíclicos que podem agir como substratos ou inibidores do SMH por sofrerem N-desmetilação durante o processo de biotransformação. Como substratos, podem induzir as subfamílias CYP1A e CYP2B. No entanto, grande parte dos fenotiazínicos inibe o P450 diretamente ou através de seus metabólitos que são altamente hidrofóbicos e podem se ligar ao grupo prostético do P450 e alterar seu ciclo catalítico (Avakumov et al., 1978, Murray & Reidy, 1989, Murray, 1992, Tateishi et al., 1999, Guengerich et al., 1995, Halpert, 1995, Buzukov et al., 1996, Guengerich, 1997). A inativação do citocromo P450 por compostos nitroheterocíclicos pode acontecer através de interação hidrofóbica do composto com o grupamento heme da proteína interferindo na ligação do oxigênio (Halpert, 1995). Ao serem metabolizados pelo organismo, os fenotiazínicos podem produzir uma variedade de metabólitos, tais como os fenóis, as sulfonas, os N-óxidos etc. Dentre eles os metabólitos nitrosos, tais como a TFPNO, gerada através da quebra do nitrogênio localizado na posição 4 do anel piperazínico da droga são os mais reativos e capazes de interagir com o P450 (Breyer, 1971, Mansuy et al., 1976,).

Enquanto micela, a TFP pode influenciar tanto no ambiente lipídico, quanto nas proteínas de membranas de maneira mais intensa do que na forma de monômero. Como só foram usadas concentrações acima da CMC deste composto (0,042 mM) só foi possível observar o efeito das micelas, levantando-se a hipótese de que a inativação/destruição do P450 seja causada também por interações TFP-proteína e TFP-lipídio que alterariam o ambiente microssomal. Este dado é suportado principalmente pela diminuição e deslocamento do pico de Trp (Fig.30A), indicando a exposição destes resíduos a um ambiente mais aquoso e à transferência de cargas da TFP para o Trp (Ruggieiro & Meirelles, 1998). Não podemos nos esquecer de que a inativação seletiva causada por compostos nitroheterocíclicos é comum e parece ser mais cabível devido às alterações encontradas no espectro do citocromo (Fig.12C).

O segundo xenobiótico analisado foi o Triton X-100, que assim como a TFP, possui características anfifílicas. A incubação das suspensões microssomais com este surfactante e na ausência de SRNADPH, leva a um aumento do conteúdo do citocromo b5 dependente do tempo (Fig.14A). Porém, a presença do SRNADPH nas suspensões microssomais fez com que houvesse a diminuição do conteúdo deste citocromo, chegando a zero em algumas situações, diferentemente do observado com a TFP (Fig.14B).

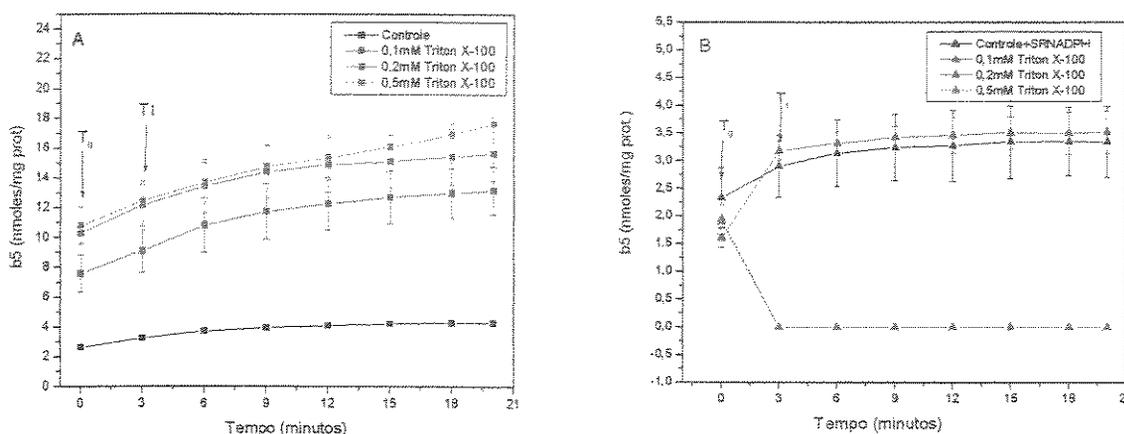


Fig.14 - Efeito do Triton X-100 no conteúdo do citocromo b5. O conteúdo do citocromo b5 em suspensão microssomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Triton X-100 foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todo o experimento foi realizado à 23°C.

Na ausência de SRNADPH há um aumento do conteúdo do citocromo b5 (Tab. 8 e 9) que provavelmente é dado pela alteração do estado de oxi-redução deste citocromo. Neste caso o Triton X-100 que está em concentrações acima de 0,1% (v/v) estaria alterando também a fluidez da membrana e aumentando o fluxo de elétrons da NADH-citocromo b5-redutase para o citocromo b5 usando apenas o cofator endógeno (Garda & Brenner, 1984).

Tab. 8 – Efeito da adição do Triton X-100 nos citocromo b5, P450 e P420. As concentrações dos citocromos (nmoles/mg prot.) foram determinadas após a adição de Triton X-100 na presença (+) e ausência (-) de Sistema Regenerador de NADPH em microsomas de *Prochilodus scrofa* (1mg/ml). As amostras foram feitas em triplicatas. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. O número entre parênteses indica a quantidade de amostras foram analisadas

Citocromos	Triton X-100 (mM)			
	0,0	0,1	0,2	0,5
b5 (-)	3,250 $\pm$ 0,0707 (2)	9,080 $\pm$ 1,4025*** <sup>a</sup> (5)	12,14 $\pm$ 1,3980*** <sup>a</sup> (5)	12,44 $\pm$ 1,3390*** <sup>a</sup> (5)
b5 (+)	2,9333 $\pm$ 0,5895 (3)	3,1667 $\pm$ 0,2083 <sup>a,*</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>a,*</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>a,*</sup> (3)
P450 (-)	1,900 $\pm$ 0,2828 (2)	0,733 $\pm$ 0,2520*** (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)
P450 (+)	0,950 $\pm$ 0,2120 (2)	0,650 $\pm$ 0,0710 (2)	0,000 $\pm$ 0,000** (2)	0,000 $\pm$ 0,000** (2)
P420 (-)	2,75 $\pm$ 0,0700 <sup>a</sup> (2)	1,733 $\pm$ 0,2082*** <sup>b</sup> (3)	0,9667 $\pm$ 0,1150*** <sup>a</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)
P420 (+)	1,25 $\pm$ 0,2120 (2)	1,267 $\pm$ 0,1150 <sup>b</sup> (3)	0,133 $\pm$ 0,0580*** <sup>a</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)

\* p<0,05, \*\* p<0,01 \*\*\*p<0,001 em relação ao controle

<sup>a</sup> p < 0,001 e <sup>b</sup> p< 0,01 em relação à presença do SRNADPH

Na Tabela 8 e também na Tabela 9 podemos observar que o SRNADPH associado ao Triton X-100, leva à redução nas concentrações do citocromo b5. Na presença de NADPH podemos observar um efeito bifásico dado pela presença do Triton X-100 na forma de monômeros e micelas. Há um aumento do conteúdo de b5 apenas em concentrações abaixo da CMC do Triton X-100, inferindo que as micelas de Triton X-100, formadas quando usamos concentrações acima da CMC, são capazes de destruir a membrana microsomal por seqüestrarem lipídios endógenos, processo acentuado pela presença do cofator. Sendo o b5 responsável pela ativação e estabilidade do P450, qualquer alteração em sua atividade provoca mudanças bruscas no processo de biotransformação de qualquer xenobiótico (Jansson et al., 1990).

Tab.9 – Efeito do Triton X-100 nos citocromos b5, P450 e "P420" após 20 minutos de incubação. As concentrações dos citocromo (nmoles/mg prot.) foram determinadas após 20 minutos de incubação com Triton X-100 na presença (+) e ausência (-) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH) em suspensões microssomais de *Prochilodus scrofa* (1mg/ml). As amostras foram feitas em triplicatas. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. O número entre parênteses indica a quantidade de amostras foram analisadas

Citocromos	Triton X-100 (mM)			
	0,0	0,1	0,2	0,5
b5 (-)	4,30 $\pm$ 0,1414 (2)	13,18 $\pm$ 1,6270*** <sup>a</sup> (5)	15,64 $\pm$ 1,8020*** <sup>a</sup> (5)	17,62 $\pm$ 0,497*** <sup>a</sup> (5)
b5 (+)	3,367 $\pm$ 0,6429 (3)	3,533 $\pm$ 0,3780 <sup>a</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>a, *</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000 <sup>a, *</sup> (3)
P450 (-)	1,019 $\pm$ 0,3270 (2)	0,1801 $\pm$ 0,0694*** (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)
P450 (+)	0,1431 $\pm$ 0,0155 (2)	0,044 $\pm$ 0,0190 (2)	0,000 $\pm$ 0,000 (2)	0,000 $\pm$ 0,000 (2)
P420 (-)	2,75 $\pm$ 0,0700*** (2)	2,50 $\pm$ 0,1730 <sup>a</sup> (3)	1,80 $\pm$ 0,264*** <sup>a</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)
P420 (+)	1,30 $\pm$ 0,1410*** (2)	1,633 $\pm$ 0,0570 <sup>a</sup> (3)	0,567 $\pm$ 0,058*** <sup>a</sup> (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)

\* p<0,05, \*\* p<0,01 \*\*\*p<0,001 em relação ao controle

<sup>a</sup> p < 0,001 em relação á presença do SRNADPH

Observando a Figura 15 nota-se que a presença de Triton X-100 causa a diminuição do conteúdo do citocromo P450 dependente do tempo e da concentração. Após 20 minutos de incubação, todas as amostras tinham o conteúdo de P450 próxima de zero (Tab. 9). A presença de SRNADPH no meio acentua a destruição do citocromo (Fig. 15B). No gel de SDS a destruição do P450 não é tão evidente devido à interferência do Triton X-100 na densidade das proteínas (Fig.16A), no entanto esta destruição fica evidente quando comparamos o perfil dos microssomas controle com os microssomas tratados com Triton X-100 em uma coluna C18 (Fig.16B). Comparando os três perfis obtidos pelo HPLC-C18 (Fig.16B) podemos observar que ocorre a interação entre o Triton X-100 e os componentes do SMH já que houve a tendência de todos os componentes do SMH ficarem mais tempos retidos na coluna, indicando um aumento da hidrofobicidade (Fig.16B – linha preta).

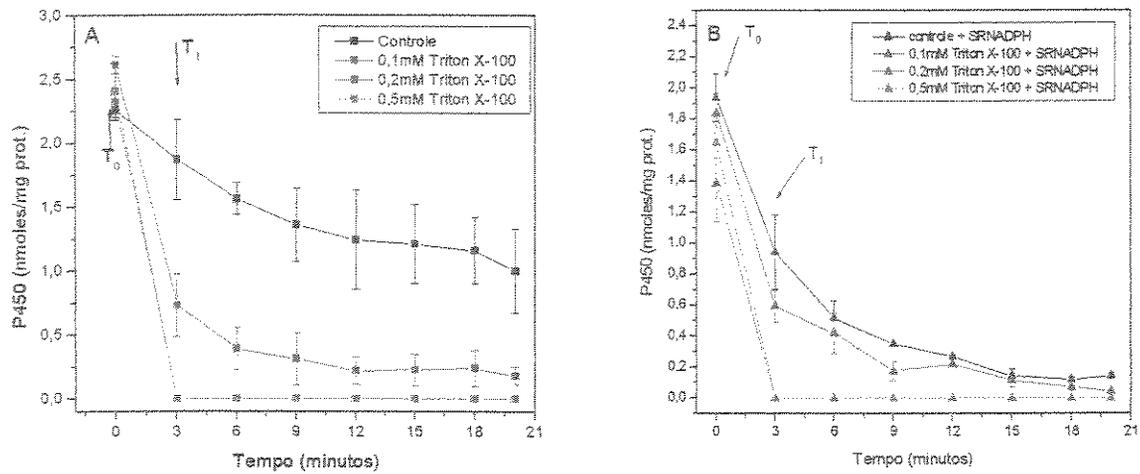


Fig. 15 - Efeito do Triton X-100 no conteúdo do citocromo P450. O conteúdo do citocromo P450 em suspensão microsomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Triton X-100 foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todo o experimento foi realizado à 23°C.

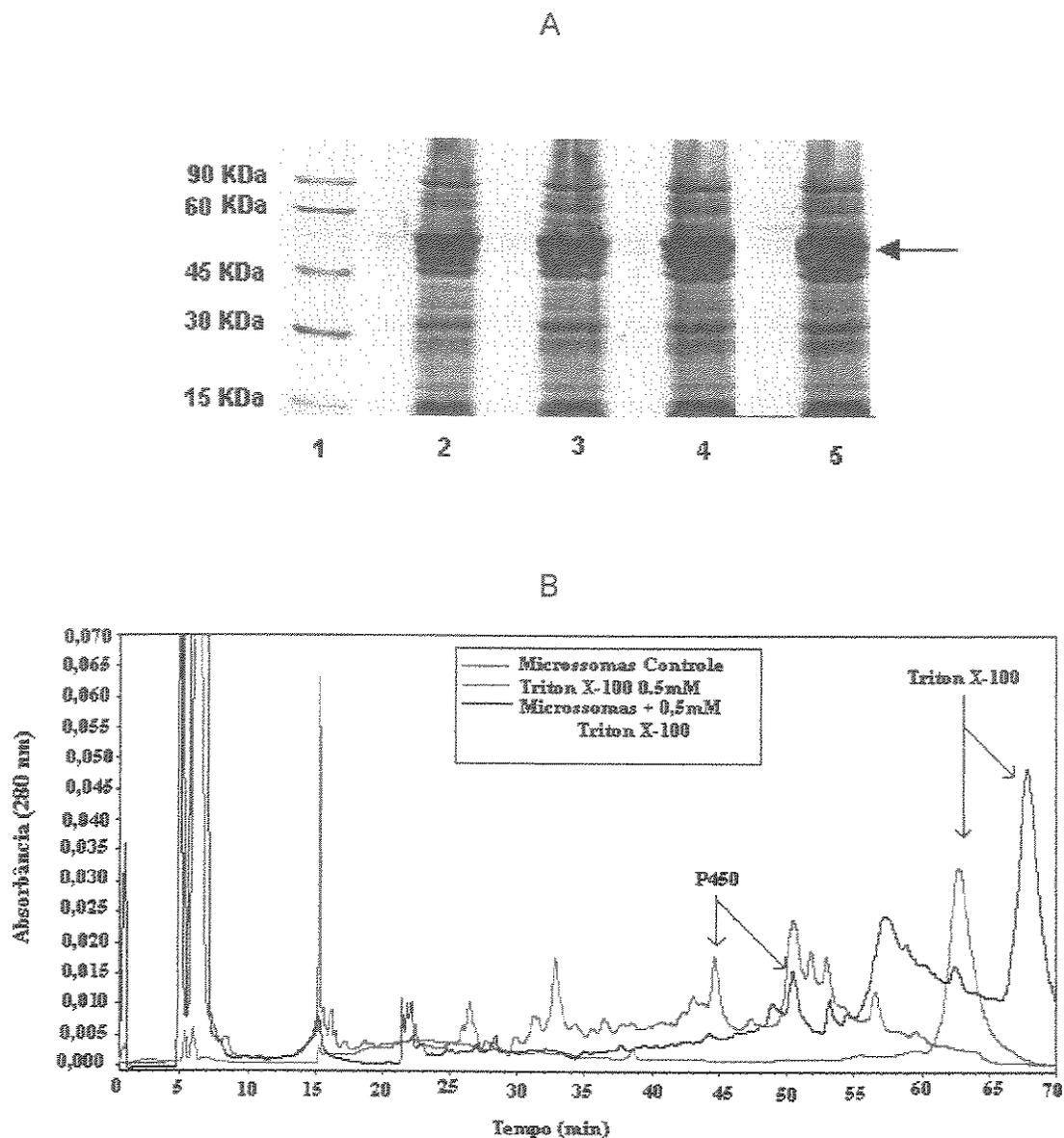


Fig. 16 – Interação dos componentes do Sistema Microssomal Hepático de *Prochilodus scrofa* com Triton X-100. (A) SDS – Page de microsomas 10,08 mg/ml tratados com diferentes concentrações de Triton X-100. (1) Marcadores de massa molecular, (2) Controle, (3) 0,1mM de Triton X-100, (4) 0,2mM de Triton x-100 e (5) 0,5mM de Triton X-100. (B) Perfil da interação dos microsomas com 0,5mM de Triton X-100 através do HPLC. As setas indicam a posição do citocromo P450 (54.000Da) e do Triton X-100.

Quando o citocromo P450 está destruído, são esperados altos níveis de P420, a forma solúvel do P450. A Figura 17 mostra que o SRNADPH diminui o conteúdo de “P420” de maneira mais acentuada do que na ausência do cofator, indicando que o NADPH associado ao xenobiótico destrói o SMH. Em

concentrações inferiores a CMC e na presença de SRNADPH é possível observar um aumento pouco significativo no conteúdo do citocromo. Porém, em concentrações próximas ou superiores a CMC há destruição do P450 assim que o detergente é adicionado ao sistema. Após 6 minutos de incubação das amostras com e sem NADPH é possível observar um aumento da concentração do citocromo que absorve em 420nm (Fig. 17). Tal constatação nos permite dizer que na suspensão tratada com Triton X-100 há tanto o P450 na forma solúvel – já que o Triton X-100 estaria destruindo o P450 por solubilizar a membrana microssomal – como a heme proteína desconhecida, uma vez que ambos absorvem na faixa 418-420nm.

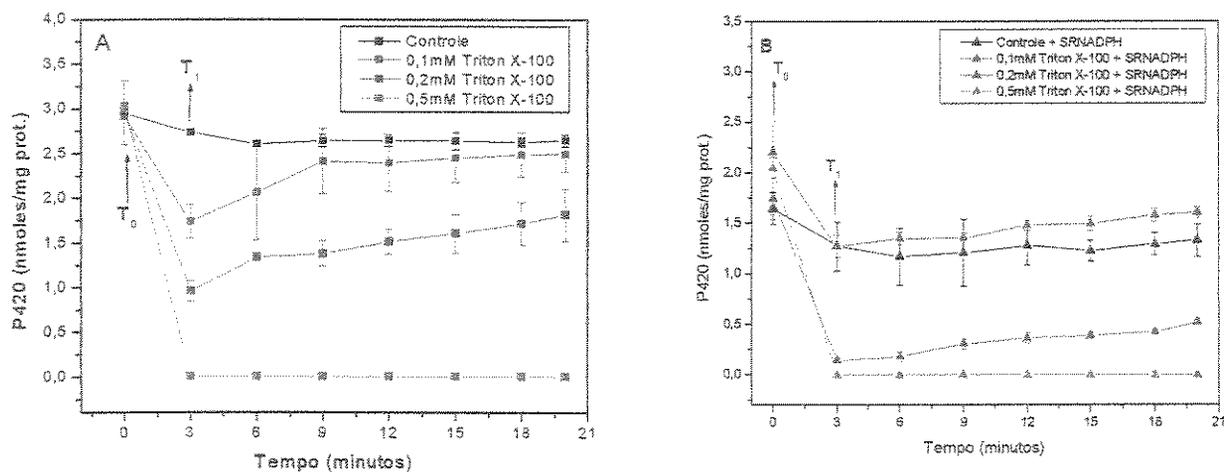


Fig. 17 - Efeito do Triton X-100 no conteúdo do citocromo "P420". O conteúdo do citocromo "P420" em suspensão microssomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Triton X-100 foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todo o experimento foi realizado à 23°C.

De todos os xenobióticos analisados, o Triton x-100 é o surfactante que apresenta maior CMC (0,25 mM), ou seja, em concentrações inferiores a esta não seria de se esperar a destruição do sistema, como demonstrado em outros trabalhos (Hosea e Guengerich, 1998, Inouye et al., 2001). No entanto podemos

observar que em concentrações inferiores a da CMC já é possível observar a destruição do sistema, inferindo que mesmo na forma de monômeros o Triton X-100 pode levar à diminuição do conteúdo do P450 (Tab. 8 e Tab. 9). Embora seja tentador dizer que os monômeros de Triton X-100 estariam levando a diminuição do conteúdo de P450 por alterarem o ambiente de membrana, não podemos nos esquecer que o Triton X-100 possui um grupamento alquil hábil em interagir com o grupamento heme do P450, levando-o à destruição por alquilação do seu sítio ativo (Hosea & Guengerich, 1998, Halpert, 1995, de Montellano & Correa, 1983). Em concentrações acima da CMC, o Triton X-100 formaria micelas mistas, ou seja, compostas por moléculas do próprio surfactante e de lipídios seqüestrados da membrana microssomal, destruindo a permeabilidade seletiva da membrana e levando a alterações conformacionais e funcionais dos componentes da membrana microssomal (Robinson & Tanford, 1975, Attwood & Florence, 1983, Garda & Brenner, 1984, Jones, 1999).

Assim propomos que a destruição do SMH pelo Triton X-100 é causada pela alquilação do grupamento heme das proteínas do SMH associada a alterações na estrutura da vesícula microssomal.

Ao tratar a suspensão microssomal com Tween 80, observou-se efeitos semelhantes aos encontrados para Triton X-100, onde novamente o cofator intensificou a destruição dos componentes do SMH, como podemos perceber a partir dos dados das Tabelas 10 e 11.

Tab. 10 – Efeito da adição de Tween 80 nas concentrações dos citocromos b5, P450 e “P420”. As concentrações dos citocromo (nmoles/mg prot.) foram determinadas após a adição de Tween 80 na presença (+) e ausência (-) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH) em microsomas de *Prochilodus scrofa* (1mg/ml). As amostras foram feitas em triplicatas. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. O número entre parênteses indica a quantidade de amostras foram analisadas.

Citocromos	Tween 80 (mM)			
	0,0	0,1mM	0,2mM	0,5mM
b5 (-)	3,250 $\pm$ 0,0707 (2)	9,680 $\pm$ 1,479 <sup>***, a</sup> (5)	10,32 $\pm$ 0,942 <sup>***, a</sup> (5)	10,02 $\pm$ 1,712 <sup>***, a</sup> (5)
b5 (+)	2,9333 $\pm$ 0,586 (3)	2,80 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup> (3)	3,10 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup> (3)	3,40 $\pm$ 0,173 <sup>a</sup> (3)
P450 (-)	1,950 $\pm$ 0,2828 (2)	1,50 $\pm$ 0,10 (3)	2,233 $\pm$ 0,115 (3)	0,833 $\pm$ 0,2082 <sup>***</sup> (3)
P450 (+)	0,950 $\pm$ 0,2121 <sup>b</sup> (2)	1,233 $\pm$ 0,2528* (2)	0,833 $\pm$ 0,1528 (2)	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>***</sup> (2)
P420 (-)	2,75 $\pm$ 0,070 <sup>***, a</sup> (2)	2,433 $\pm$ 0,153 <sup>a</sup> (3)	2,367 $\pm$ 0,057 <sup>a</sup> (3)	1,233 $\pm$ 0,058 <sup>***</sup> (3)
P420 (+)	1,25 $\pm$ 0,212 <sup>***</sup> (2)	1,133 $\pm$ 0,153 <sup>a</sup> (3)	0,867 $\pm$ 0,153 <sup>***, a</sup> (3)	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>***, a</sup> (3)

\* p<0,05, \*\* p<0,01 \*\*\*p<0,001 em relação ao controle

<sup>a</sup> p < 0,001 e <sup>b</sup> p < 0,01 em relação á presença do SRNADPH

A ausência de cofator aumentou o conteúdo do citocromo b5 em relação ao controle (Tab.11, Fig.18A). Contudo esta diferença não é estatisticamente significativa ao final de 20 minutos de incubação (Tab.11). Na presença do cofator ocorre a destruição total do citocromo b5 a partir de 6 minutos de incubação (Fig.18B). Quando o surfactante é adicionado ao sistema há um pequeno aumento da concentração do b5 em relação ao controle, estatisticamente não é significativa, indicando que não houve alterações no conteúdo deste citocromo (Fig.18B).

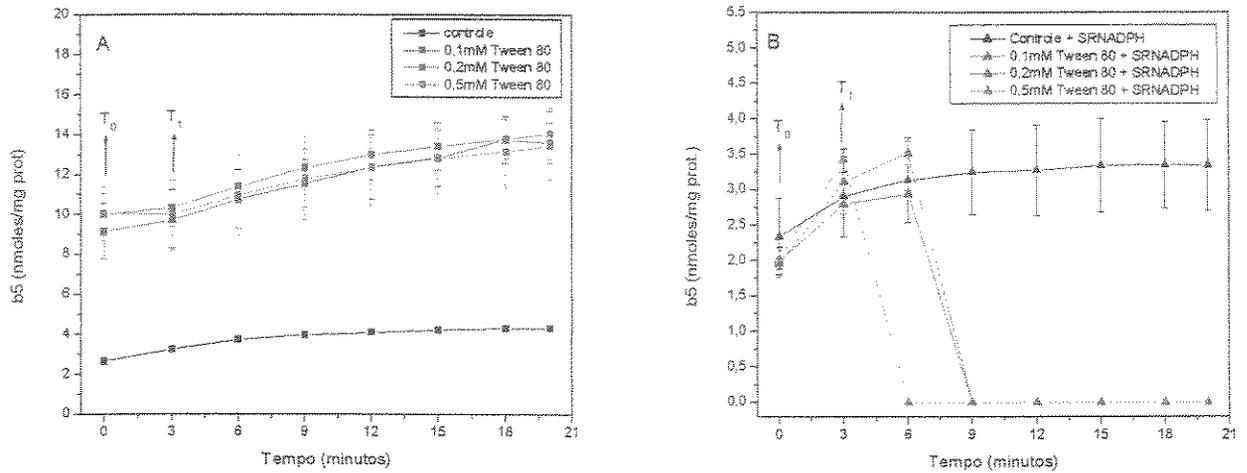


Fig. 18 - Efeito do Tween 80 no conteúdo do citocromo b5. O conteúdo do citocromo b5 em suspensão microssomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Tween 80 foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todo o experimento foi realizado à 23°C.

Tab.11 – Efeito do Tween 80 nas concentrações do citocromo b5, P450 e “P420” após 20 minutos de incubação. As concentrações dos (nmoles/mg prot.) foram determinadas após 20 minutos de incubação na presença (+) e ausência (-) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). As suspensões microssomais de *Prochilodus scrofa* (1mg/ml) foram incubadas com 0,1mM, 0,2mM e 0,5mM de Tween 80. As amostras foram feitas em triplicatas. Os valores são expressos em média ± desvio padrão da média. O número entre parênteses indica quantidade de amostras foram analisadas

	Controle	0,1mM	0,2mM	0,5mM
b5 (-)	4,30 ± 0,0141 (2)	1,3725 ± 0,1345***, a (5)	1,38 ± 0,10***, a (5)	1,312 ± 0,180***, a (5)
b5 (+)	0,3367 ± 0,0643 (3)	0,00 ± 0,00 <sup>a, *</sup> (3)	0,00 ± 0,00 <sup>a, *</sup> (3)	0,00 ± 0,00 <sup>a, *</sup> (3)
P450 (-)	0,1019 ± 0,0327 (2)	0,03486 ± 0,0175*** (3)	0,00 ± 0,00*** (3)	0,00 ± 0,00*** (3)
P450 (+)	0,1431 ± 0,0169 <sup>a</sup> (2)	0,2928 ± 0,0169* (2)	0,00 ± 0,00 (2)	0,00 ± 0,00 (2)
P420 (-)	2,60 ± 0,00 <sup>a</sup> (2)	1,067 ± 0,208***, b (3)	0,933 ± 0,153***, a (3)	0,167 ± 0,057*** (3)
P420 (+)	1,300 ± 0,141 <sup>a</sup> (2)	0,567 ± 0,057***, b (3)	0,233 ± 0,115***, a (3)	0,00 ± 0,00*** (3)

\* p<0,05, \*\* p<0,01 \*\*\*p<0,001 em relação ao controle

<sup>a</sup> p < 0,001 e <sup>b</sup> p < 0,01 em relação á presença do SRNADPH

Foram observadas diminuições nas concentrações de P450 independentemente da presença do cofator e tempo de incubação (Tab.10 e Tab.11). Este comportamento foi semelhante aquele observado com Triton X-100; no entanto, esta diminuição foi mais gradual em Tween 80, chegando a zero após 12 minutos de incubação (Fig.19A).

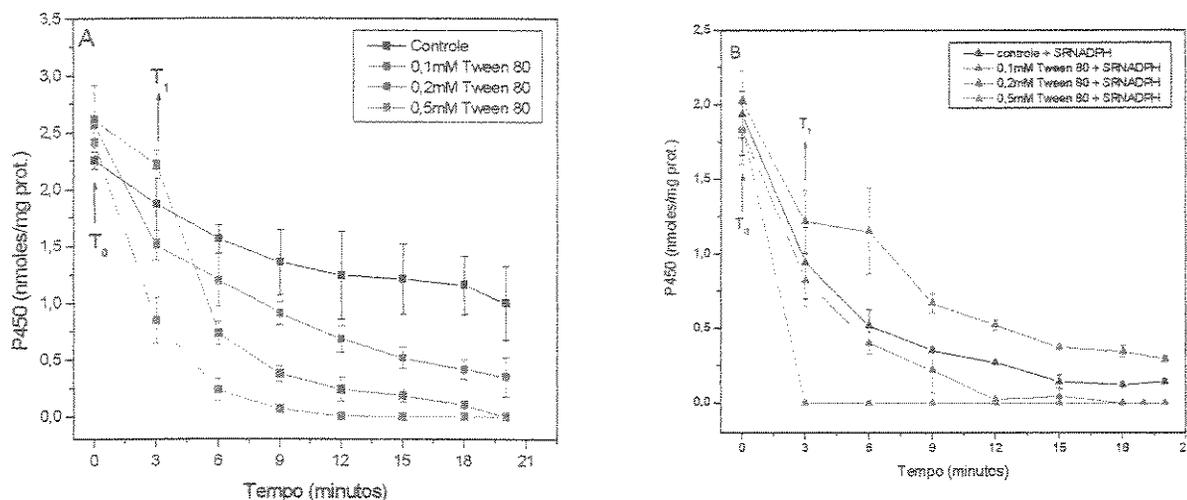


Fig. 19 - Efeito do Tween 80 no conteúdo do citocromo P450. O conteúdo do citocromo P450 em suspensão microssomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Tween 80 foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todo o experimento foi realizado à 23°C.

Na presença do cofator e com 0,1mM Tween 80 pode-se observar um aumento no conteúdo do P450 em relação ao controle (Tab.10, Fig.19B), indicando a possível metabolização do Tween 80 pelo sistema microssomal hepático, tal hipótese é confirmada através dos resultados da enzima Etoxiressorufin-O-deetilase, mostrados nas páginas posteriores. No entanto, é válido lembrar que após 20 minutos de incubação a concentração de P450 diminuiu em relação ao momento no qual o xenobiótico foi adicionado ao sistema, mostrando que o citocromo está sendo totalmente destruído (Fig.19B). Aplicando

as amostras incubadas após 20 minutos com Tween 80 em um gel de SDS, observamos uma sutil diminuição da intensidade da banda correspondente ao P450 (Fig.20A) e confirmamos a sua destruição através do desaparecimento do pico referente ao P450 na análise por HPLC (Fig.20B).

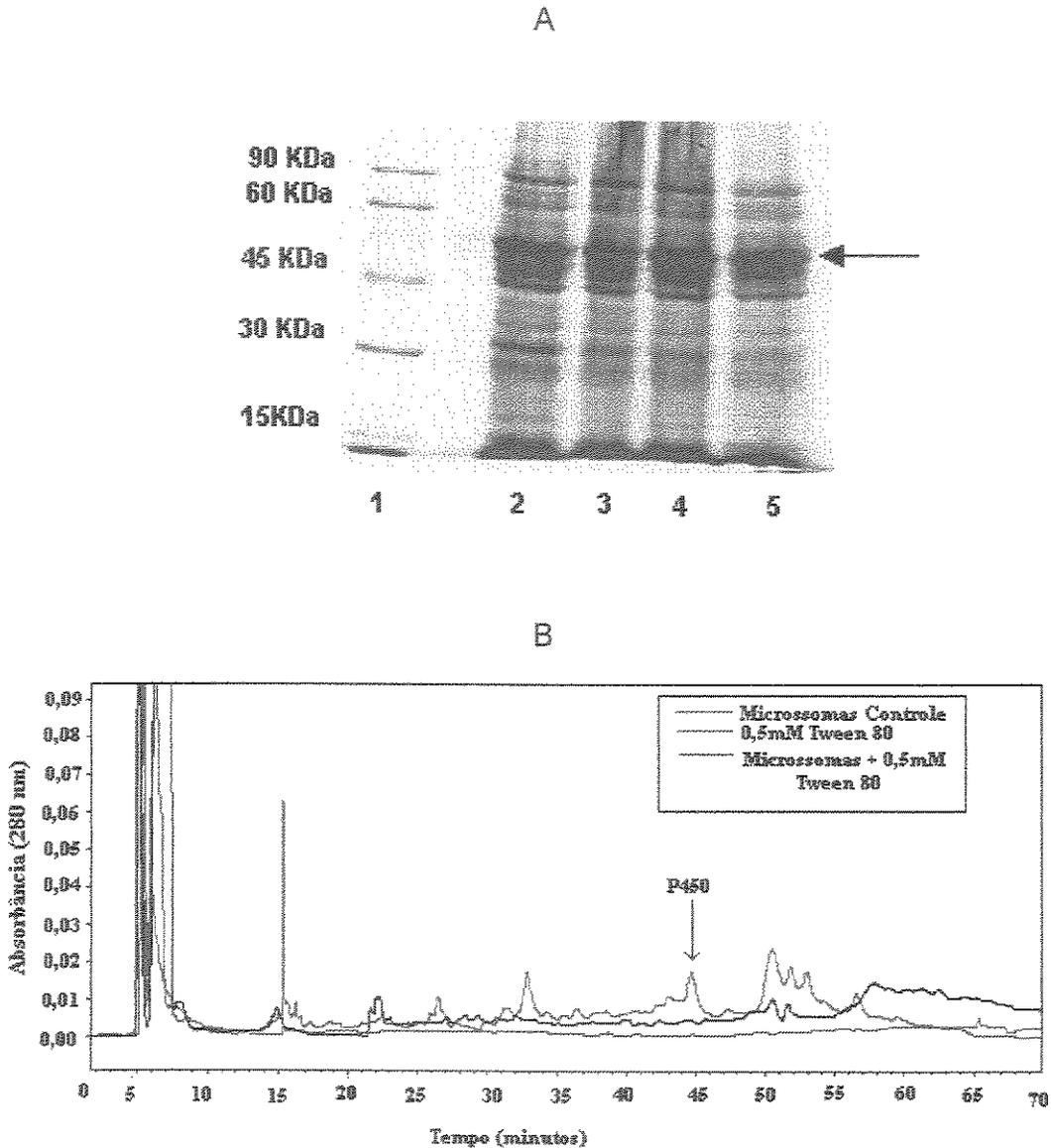


Fig. 20 – Interação do Tween 80 com os componentes do Sistema Microsomal Hepático de *Prochilodus scrofa*. (A) SDS – Page de microsomas 10,08 mg/ml tratados com diferentes concentrações de Tween 80. (1) Marcadores, (2) Controle, (3) Tween 80 0,1mM, (4) Tween 80 0,2mM e (5) Tween 80 0,5mM. (B) Perfil da interação dos microsomas com 0,5mM de Tween 80 através do HPLC. A seta indica a posição do citocromo P450 (54.000Da).

A CMC do Tween 80 (0,012 mM) é inferior às concentrações utilizadas nos experimentos, sendo assim este surfactante está presente na suspensão microsomal apenas na forma de micelas, o que pode ter alterado o ambiente lipídico da membrana microsomal. Como a atividade do P450 é altamente dependente do ambiente lipídico, sua destruição estaria ligada à desestabilização da membrana gerada pelo seqüestro de fosfolipídios, em especial fosfatidilcolina, pelo surfactante e alterando o processo de transferência de elétrons (De Pierre & Dallner, 1975, Guengerich, 1977, Benhardt, 1995, Yun et al., 1996, Vérgeres et al., 1989). A TFP também foi usada em concentrações acima da sua CMC sendo encontrada na suspensão microsomal apenas na forma de micelas. No entanto, a TFP e o Tween 80 atuam diferentemente na membrana microsomal e nas suas proteínas, o que pode ser justificado não só pela estrutura dos xenobióticos, mas também pelo fato de que a TFP está sendo metabolizada pelo sistema, o que diminui a porcentagem de Trifluoperazina livre e capaz de formar micelas e interagir diretamente com o P450.

Embora a CMC do Triton X-100 seja maior que a do Tween 80, ambos possuem o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) (Tab.2) e a estrutura química (Fig. 6B e 6C, respectivamente) diferentes, o que lhes confere diferentes graus de hidrofobicidade (Attwood & Florence, 1983). O Triton X-100 é um solubilizador de membranas mais potente que o Tween 80 devido a sua HLB. A grande cabeça apolar e a alta HLB do Tween 80 fazem com que este surfactante não seja um bom solubilizador de membranas, já que estas duas características diminuem sua capacidade de deslipidação, impedindo a formação de micelas mistas nos mesmos níveis que o Triton X-100 (Attwood & Florence, 1983, de Foresta et al., 1989).

Observou-se uma diminuição nas taxas de "P420" que acompanharam as taxas de diminuição de P450 tanto na ausência como na presença de SRNADPH, persistindo mesmo após 20 minutos de incubação (Tab. 9 e Tab.10). O fato de não haver aumento nas concentrações de "P420" sugere que não está

havendo a desnaturação do citocromo e, o que estamos demonstrando na Figura 21, é apenas a heme proteína com características semelhantes ao P450 (Leitão et al., 2000).

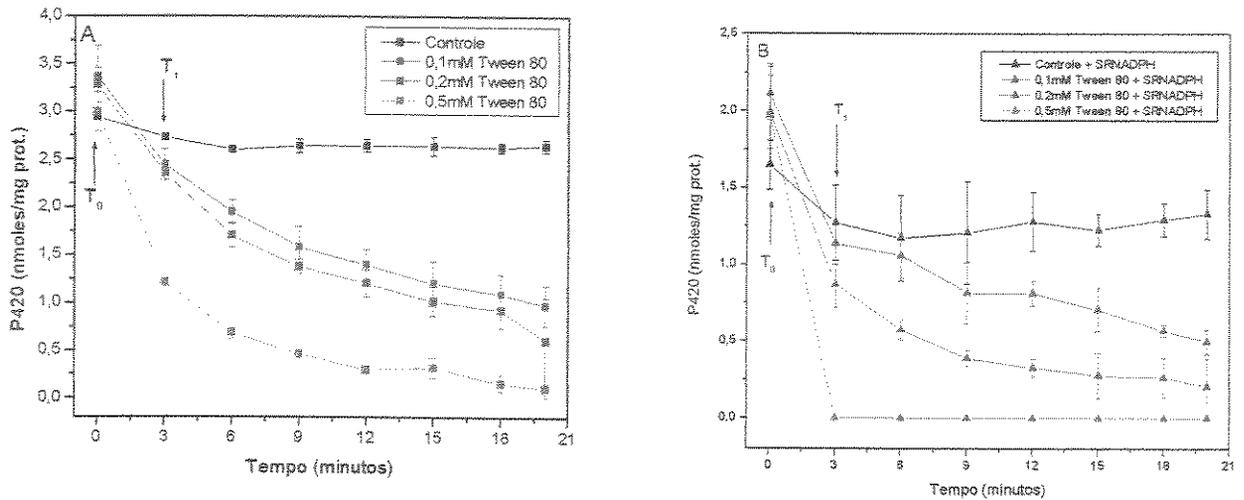


Fig. 21 - Efeito do Tween 80 no conteúdo do citocromo "P420". O conteúdo do citocromo "P420" em suspensão microsomal (1mg/ml) tratada com diferentes concentrações de Tween 80 foi determinado na ausência (A) e na presença (B) de Sistema Regenerador de NADPH (SRNADPH). T<sub>0</sub> representa as amostras sem qualquer xenobiótico e T<sub>1</sub> representa o momento em que o xenobiótico foi adicionado no sistema. Todo o experimento foi realizado à 23°C.

Diversos estudos têm demonstrado que detergentes não-iônicos podem inibir a atividade do P450 através de um mecanismo dependente da concentração (Hosea & Guengerich, 1998, Yun et al., 1996, Yun et al., 1997 Guengerich et al., 1998). Abaixo da CMC a inibição estaria ocorrendo através de interações específicas entre o detergente e o sítio ativo do P450, explicando a diminuição gradual do seu conteúdo. Quando as concentrações estão acima da CMC, o que ocorre na maioria das vezes, a diminuição do conteúdo do P450 é mais drástica, porque nestas condições os surfactantes (TFP, Triton X-100 e Tween 80) estariam destruindo a integridade da membrana e do sítio catalítico do P450 (Hosea & Guengerich, 1998, Guengerich, 1998). O Triton X-100 é, portanto, capaz de

destruir o P450 através de meios específicos, como a alquilação do grupamento heme deste citocromo e meios menos específicos, como o seqüestro de fosfolipídios da membrana microssomal, a formação de micelas mistas e a interação em diferentes pontos das proteínas que compõem o SMH. Por outro lado, o Tween 80 estaria causando a destruição do P450 por meios menos específicos, como a formação de micelas mistas.

A destruição do P450 pode ser, ou não, acompanhada, por modificação na sua conformação. Yun e colaboradores (1996, 1997) demonstraram que a atividade do P450 depende da presença de fosfolipídios para que estes mantenham o citocromo ancorado na membrana e facilitem o fluxo de elétrons da redutase para o P450. A presença de surfactantes também pode alterar o conteúdo de  $\alpha$ -hélice e folhas- $\beta$  do citocromo ao se ligarem no sítio catalítico, impedindo uma interação estável entre a proteína e a membrana (Omura e Sato, 1964a, Yun et al., 1996, Yun et al., 1997, Hosea & Guengerich, 1998).

Os três xenobióticos estudados, TFP, Triton X-100 e Tween 80 apresentam características anfifílicas, indicando um alto grau de interações hidrofóbicas entre as moléculas de surfactantes e o lipídio (micela mista), e o surfactante com lipídios e proteínas (Jones, 1999, le Maire, 2000, Malheiros et al., 2000). Esta última interação estaria sendo causada principalmente pelo Triton X-100 que alteraria a membrana e por formar micelas compostas de surfactantes e lipídios endógenos expondo, assim, a porção hidrofóbica da proteína inativando-a por alterar sua carga e/ou conformação. Enquanto monômero o Triton X-100 também influencia o ambiente de membrana e a estrutura do P450 como dito anteriormente. O Tween 80 e a TFP se encontram na suspensão microssomal sempre na forma de micelas. No entanto seus efeitos sobre a membrana e os citocromos b5 e P450 são menos deletérios que o Triton X-100, uma vez que a estrutura da TFP (Fig.6A) e do Tween 80 (Fig.6B) os impedem de seqüestrar lipídios da membrana microssomal com a mesma eficiência que o Triton X-100,

sugerindo que estes dois xenobióticos interagem preferencialmente com as proteínas do SMH.

A presença do NADPH também é um fator que pode levar ao aumento nas taxas de destruição do P450 tanto na ausência ("futile cycle") quanto na presença de substrato (Soucek et al., 1994). O cofator associado ao xenobiótico aumentaria as taxas de destruição do citocromo em sistemas *in vitro* pois o NADPH teria o papel de ativador dos produtos da biotransformação, tornando-os mais reativos e capazes de atacar o grupamento heme do P450, do b5 e do "P420" (Marczylo & Ioannides, 1999). A destruição da integridade do P450 acontece mesmo na ausência do SRNADPH, indicando que tal efeito é resultado direto dos xenobióticos e não de um mecanismo baseado na inativação ou na ação suicida destes substratos sobre o P450 (Fent et al., 1998).

As diminuições nas concentrações de P450 ocorridas durante os 20 minutos de incubação são geradas não só pela ação dos xenobióticos nas enzimas estudadas, mas também pela própria instabilidade do sistema microssomal, já que as diminuições aconteceram mesmo na ausência de substrato. Um dos fatores que levou à perda da atividade catalítica foi o NADPH. Este cofator estaria estimulando a peroxidação lipídica na membrana microssomal e a conseqüente geração de radicais livres do oxigênio que afetariam não só o P450, mas também o citocromo b5 e a NADPH citocromo P450 redutase (Levin et al., 1973, Re et al., 1999).

Assim como a interação da TFP em membranas de eritrócitos é bastante influenciada pelas características surfactantes desta droga (Malheiros et al., 2000), podemos inferir que este mesmo efeito estaria ocorrendo na membrana microssomal. Na forma de micelas a TFP levaria a perturbações na membrana microssomal que contribuiriam para a alteração da conformação das proteínas do SMH. Associada a isto, os metabólitos nitrosos provenientes da metabolização da TFP estariam levando a inativação seletiva do P450.

Existem duas hipóteses para a destruição do P450 pelos xenobióticos. A primeira delas corresponde ao modo de ação da TFP. Este xenobiótico se ligaria a aminoácidos do sítio ativo da proteína, em especial, a cisteína e histidina que compõem a porção da globina do citocromo. Ao reagir com o grupamento tiol (-SH) do P450 levaria a perturbações no centro de ligação do substrato e inativaria a porção catalítica do P450 (Fent & Stegeman, 1991, Labella, 1991, Fent & Bucheli, 1994, Fent et al., 1998, Re et al., 1999, Yanev et al., 2000). Este xenobiótico é um composto que contém enxofre na sua estrutura, que pode competir com a cisteína na ligação do Fe III levando a alterações no espectro P450 reduzido por CO, hipótese confirmada pela diminuição da absorção em 418 nm e o deslocamento do pico do citocromo P450 para 455nm, indicando que uma possível interação do fenotiazínico com o ferro-heme pode levar à perda da atividade catalítica de algumas isoformas por impedir a ligação do oxigênio ao centro de ligação da proteína (Yanev et al., 2000).

Já no caso dos surfactantes não iônicos, Triton X-100 e Tween 80, a hipótese para a destruição do P450 estaria mais ligada aos efeitos destes compostos na membrana microssomal. O Triton X-100 levaria à formação de micelas compostas por moléculas de surfactantes e fosfolipídios de membrana quando os detergentes estivessem em concentrações acima da CMC. Associado ao efeito de membrana, o Triton X-100 estaria causando a alquilação do grupamento heme do P450 e, conseqüentemente, a diminuições no conteúdo total destas proteínas. Por outro lado, o Tween 80 parece estar interagindo tanto com o P450 quanto com a membrana microssomal, desestabilizando-a e destruindo o sistema microssomal hepático.

Uma terceira hipótese seria a inibição de alguns passos do ciclo catalítico do P450, em especial a transferência de elétrons da redutase para o citocromo P450 (de Montellano & Correia, 1983, Guengerich et al., 1995, Halpert, 1995, Guengerich et al., 1998). No caso da TFP esta inibição não está ocorrendo na transferência de elétrons do b5 para o P450, uma vez que o conteúdo deste

citocromo é proporcional ao aumento das concentrações da TFP. No entanto no caso dos dois surfactantes não-iônicos a perda de atividade do b5 sugere a inibição do ciclo ainda neste passo catalítico, fundamental para a ativação do P450.

O sistema P450 desempenha um papel fundamental no metabolismo de xenobióticos. Este estudo demonstrou que a Trifluoperazina, o Triton X-100 e o Tween 80 são hábeis em interagir com o sistema microsomal hepático de *Prochilodus scrofa*. A interferência destes xenobióticos no sistema enzimático pode causar alterações no funcionamento do organismo, uma vez que o P450 participa das vias de síntese de moléculas importantes, como os esteróides e ácidos graxos. A maioria dos estudos de interação entre xenobióticos e sistema o microsomal visam apenas a ativação do sistema, no entanto, o presente trabalho mostrou que os surfactantes utilizados na solubilização de pesticidas e com alta hidrofobicidade podem inibir, ou mesmo destruir, os constituintes do sistema P450 e, por conseqüência, alterar funções biológicas importantes como a resposta imune, a reprodução e o desenvolvimento.

Visando complementar os estudos dos efeitos dos xenobióticos no sistema microsomal hepático de *Prochilodus scrofa*, analisamos o que ocorre com enzimas envolvidas no processo de biotransformação: a NADPH-citocromo P450 redutase (Fase I) e a Glutathiona-S-Transferase (Fase II).

#### **4.3.2 – NADPH CITOCROMO P450 REDUTASE – NCR**

A interação entre o P450 e a NADPH-citocromo P450 redutase é um pré-requisito para a transferência de elétrons, a ativação do oxigênio e a conversão do substrato. Qualquer alteração neste passo catalítico pode comprometer o processo de biotransformação ao impedir a ativação do P450.

Entre os três xenobióticos estudados a TFP foi o único que levou ao aumento da atividade da NCR proporcional ao aumento da concentração do xenobiótico (Fig. 22A). Após 20 minutos de incubação a enzima continua com alta atividade (Tab. 12), indicando que, apesar das concentrações de P450 estarem diminuindo, ela está ativa e fornecendo elétrons para o citocromo, reforçando a hipótese de que a TFP levaria a inibição de algumas isoformas do P450.

Tab.12 – Efeitos dos xenobióticos na atividade da NADPH citocromo P450 redutase. A atividade da NADPH citocromo P450 redutase em *Prochilodus scrofa* foi determinada após 20 minutos de incubação com diferentes concentrações de Trifluoperazina, Triton X-100 e Tween 80 (suspensão microssomal 0,07mg/ml). Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $\mu$ moles/mg prot.). O número entre parênteses indica a quantidade de amostras analisadas. A atividade da enzima era medida à 23°C.

	0,0 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM
TFP	15,260 $\pm$ 1,327 (3)	108,77 $\pm$ 27,144 (8)	328,48 $\pm$ 57,974**** (8)	1339,7 $\pm$ 168,99**** (8)
Triton X-100	15,260 $\pm$ 1,327 (3)	29,600 $\pm$ 1,700*** (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)
Tween 80	15,260 $\pm$ 1,327 (3)	23,457 $\pm$ 1,620*** (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)	0,000 $\pm$ 0,000*** (3)

\*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle

Quando a suspensão microssomal foi incubada com Triton X-100 foi possível observar um declínio acentuado na atividade da enzima após a adição de concentrações superiores a 0,1mM do xenobiótico. Nas concentrações de 0,2 mM de Triton X-100 a atividade da NCR foi nula, indicando que a desestruturação da membrana é responsável por alterações no sistema microssomal hepático (Tab.12). Observando a Figura 22B, nota-se que apenas na concentração de 0,1mM de Triton X-100 a enzima está ativa, tal como aconteceu com os citocromos b5 e P450, sugerindo assim que acima da CMC o surfactante pode destruir a membrana impedindo a ativação do sistema.

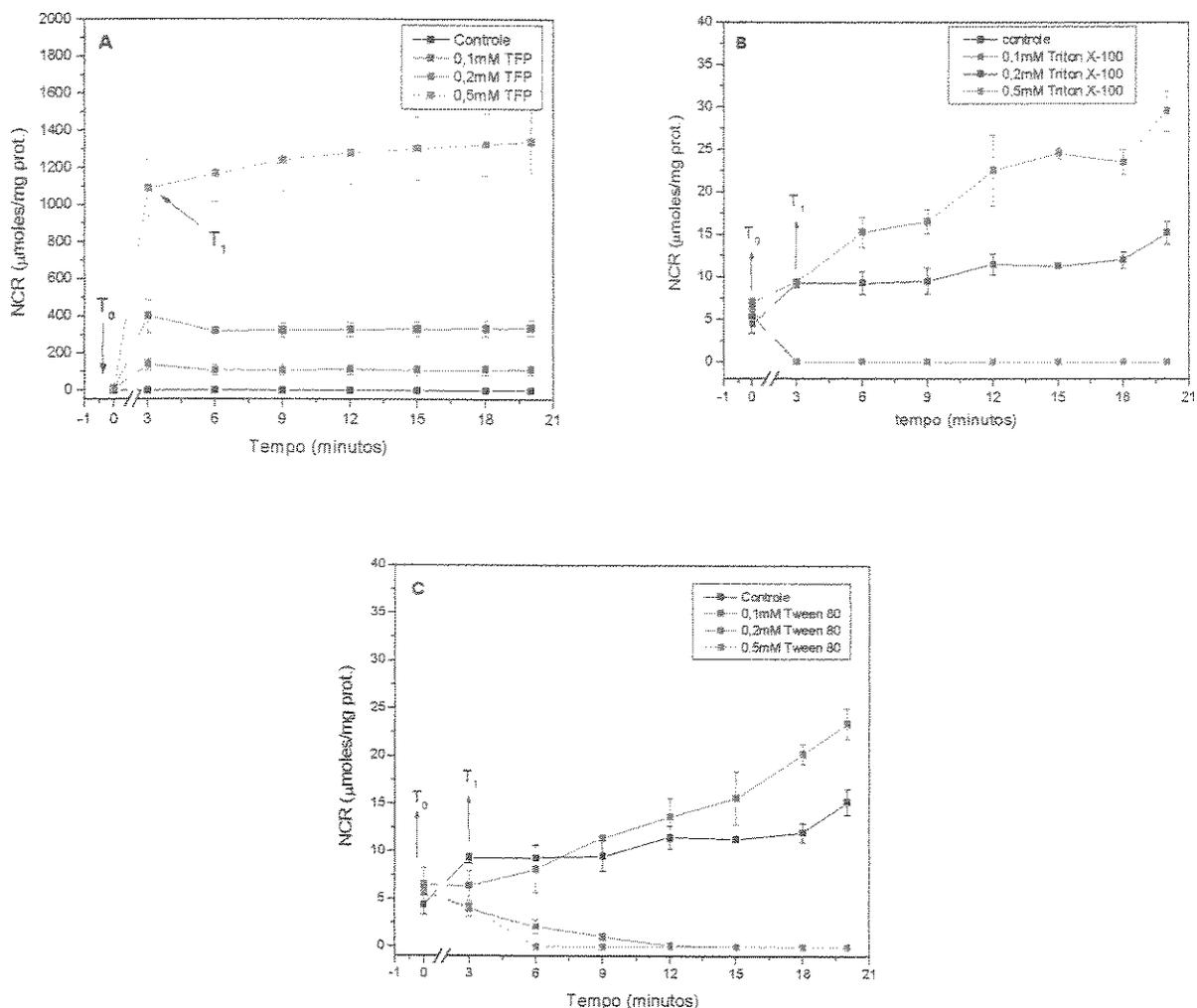


Fig. 22 – Efeito do tempo na atividade da NADPH citocromo P450 redutase. A atividade da enzima NADPH citocromo P450 redutase foi determinada em suspensão microsomal 0,07mg/ml tratadas com diferentes concentrações de cada xenobiótico, TFP (A), Triton X-100 (B) e Tween 80 (C). Os ensaios foram realizados à 23°C. Em T<sub>0</sub> as amostras estão sem o xenobiótico e em T<sub>1</sub> as concentrações no momento em que o xenobiótico foi adicionado ao sistema. A quebra de linha é para mostrar que de 0-3 minutos não houve aumento da atividade, uma vez que a droga só foi adicionada após 3 minutos de incubação.

A incubação da suspensão microsomal com diferentes concentrações de Tween 80 mostrou que este xenobiótico também causa a inibição da enzima em concentrações de 0,2 e 0,5 mM (Tab.12, Fig. 22C), assim como ocorreu com o citocromo P450 (Fig.19), sugerindo um sinergismo entre as duas proteínas. Esta constatação intensifica a hipótese de que a inativação do P450 estaria ligada não

só a alterações no ambiente lipídico da membrana, mas também a inibição de alguma etapa do seu ciclo catalítico e a interação direta do surfactante com a proteína.

Sabe-se que há uma interação entre a NADPH citocromo P450 redutase e o citocromo P450 com o objetivo de aumentar a atividade deste citocromo ao intensificar o fluxo de elétrons da redutase para o citocromo P450 e com isto aumentar a eficiência da biotransformação de um dado composto (Nebert & Gonzalez, 1987, Yun et al., 1997). Os fosfolipídios de membrana parecem ser essenciais para que ocorra a formação e a manutenção deste complexo, de modo que qualquer mudança neste ambiente alteraria a formação do complexo, afetando a atividade do citocromo (Yun et al., 1996, Yun et al., 1997).

Os fosfolipídios são responsáveis por aumentarem a interação P450-NCR formando agregados que facilitam a transferência de elétrons. Sem os fosfolipídios não há a formação destes agregados. As teorias atuais dizem que os fosfolipídios aumentariam as interações P450-NCR e P450-substrato por incorporá-los em vesículas carregadas negativamente. Os detergentes levariam, portanto, à perda da atividade enzimática por desintegrarem estes agregados, diminuindo a interação entre os diferentes componentes do SMH (Imaoka et al., 1992).

Neste caso, não só a inibição de passos catalíticos do ciclo de ativação do P450, como também as alterações conformacionais da proteína por mudanças no ambiente lipídico da membrana impediriam a interação do P450 com a NCR, diminuindo assim a atividade de ambos (Nebert & Gonzalez, 1987, Yun et al., 1996, Yun et al., 1997).

### 4.3.3 – GLUTATIONA –S – TRANSFERASE – FASE II DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Como afirmado anteriormente, a GST é uma enzima citossólica que age sobre os metabólitos da fase I da biotransformação. No entanto, nos ensaios realizados os efeitos gerados foram consequência da ação direta do xenobiótico e não de seus metabólitos.

Quando a suspensão citossólica foi incubada com diferentes concentrações de TFP, vimos que a GST apresentou um aumento da atividade proporcional ao aumento das concentrações de xenobiótico (Tab. 13). Analisando a Figura 23A, podemos observar que a enzima apresentou um comportamento bifásico. A primeira fase é composta por um aumento rápido da atividade enzimática gerado pela adição do xenobiótico ao meio, já na segunda fase quase não há alterações na atividade da enzima, sugerindo que esta teria atingido sua velocidade máxima após 9 minutos de incubação.

Tab.13 – Efeito dos xenobióticos na atividade da Glutathione-S-Transferase. A atividade da Glutathione – S - Transferase em *Prochilodus scrofa* foi determinada após 20 minutos de incubação com diferentes xenobióticos (0,056mg/ml de suspensão citossólica). Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (mmoles/mg prot.). O número entre parênteses indica quantas amostras foram analisadas. A atividade da enzima era medida á 23°C.

	0,0 mM	0,1mM	0,2mM	0,5mM
TFP	0,0651 $\pm$ 0,008 (3)	0,4324 $\pm$ 0,066 (10)	0,7645 $\pm$ 0,108* (10)	1,4864 $\pm$ 0,143*** (10)
Triton X-100	0,0651 $\pm$ 0,008 (3)	0,1412 $\pm$ 0,023*** (10)	0,2287 $\pm$ 0,035*** (10)	0,3024 $\pm$ 0,083*** (10)
Tween 80	0,0651 $\pm$ 0,008 (3)	0,2565 $\pm$ 0,0312 (8)	0,2194 $\pm$ 0,0462*** (7)	0,1864 $\pm$ 0,0234*** (8)

\* p<0,05; \*\*\*p<0,001 em relação ao controle.

Estes resultados indicam a habilidade da enzima em se conjugar com

compostos nitroheterocíclicos levando a uma ativação rápida. O nitrogênio do anel aromático da TFP parecer ser o responsável por elevar a atividade da GST em comparação aos dois outros xenobióticos (Oetari et al., 1996; Le & Franklin, 1997). No entanto, é importante enfatizar novamente que esta conjugação ocorre com os xenobióticos, não sendo possível a certeza absoluta sobre quais os verdadeiros efeitos dos metabólitos nitrosos gerados na biotransformação da TFP em relação à atividade da GST.

O Triton X-100 induziu a atividade da enzima em menor escala do que a TFP (Tab.13). A curva gerada pela adição do xenobiótico ao meio, indicou um aumento contínuo da atividade da enzima sem que houvesse a saturação da atividade da GST durante o tempo de incubação (Fig.23B).

Dos três xenobióticos analisados, o Tween 80 foi o que resultou em menores taxas de ativação da GST (Tab.13 e Fig. 23C). Após 20 minutos de incubação com 0,5 mM de Tween 80 houve um aumento da atividade da GST em 2,8 vezes, enquanto que, nas mesmas condições o Triton X-100 e a TFP aumentaram a atividade da enzima em 4,6 e 22 vezes, respectivamente.

Comparando o comportamento da enzima no momento em que cada um dos xenobióticos é adicionado ao sistema, podemos inferir que a TFP é um ativador mais potente da GST do que os dois surfactantes não-iônicos. O aumento da atividade da GST é acompanhado por aumentos proporcionais nas concentrações de P450, b5 e da atividade da NADPH citocromo P450 redutase apenas na presença de TFP. Isto indica que apenas este xenobiótico está sendo biotransformado. Porém esta afirmação não se verifica para Triton X-100 e Tween 80 já que a análise das concentrações dos citocromos b5, P450 e da enzima NADPH citocromo P450 redutase sugeriu que estes surfactantes podem provocar a destruição do SMH.

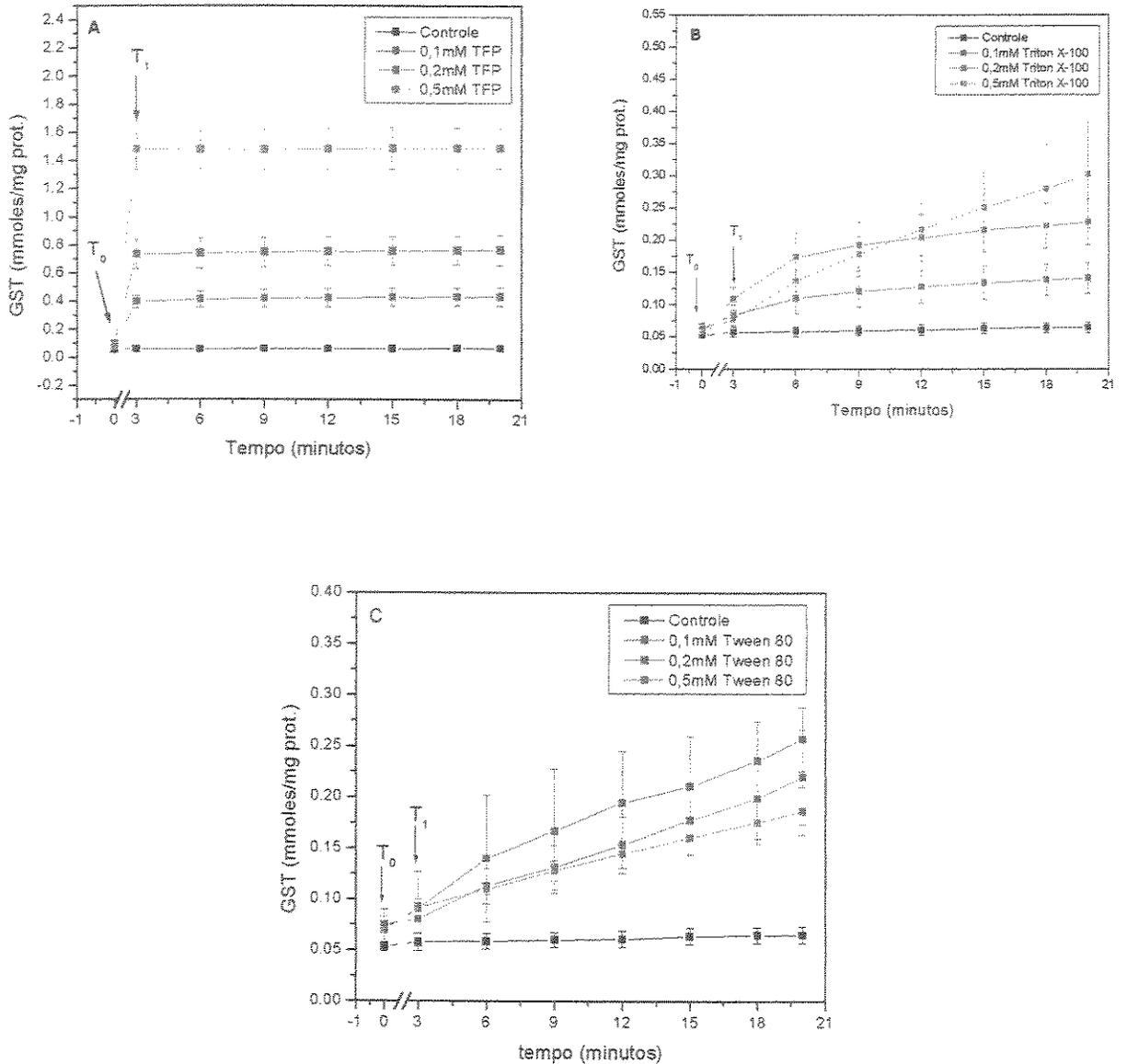


Fig. 23 – Efeito do tempo na atividade da Glutaciona-S-Transferase. A atividade da enzima Glutaciona-S-Transferase foi determinada em suspensão citossólica de *Prochilodus scrofa* tratada com diferentes concentrações dos xenobióticos estudados, TFP (A), Triton X-100 (B) e Tween 80 (C). Os ensaios foram realizados à 23° C. T<sub>0</sub> representa a amostra sem xenobiótico e T<sub>1</sub> o momento em que o xenobiótico foi adicionado ao sistema. A quebra de linha é para mostrar que de 0-3 minutos não houve aumento da atividade, uma vez que a droga só foi adicionada após 3 minutos de incubação.

Muitos autores sugerem que algumas substâncias capazes de interagir com as enzimas da fase I da biotransformação podem ser fracos ativadores ou fortes inibidores de enzimas da fase II do processo, fato que levaria a uma falha no sistema de defesa contra os metabólitos altamente reativos gerados na primeira fase do processo. Além disto, os dados de ativação da GST pelo Triton X-100 e do Tween 80 sugerem que o efeito nocivo destes dois xenobióticos está ligado à desestruturação da membrana microssomal e das proteínas nela embebidas (Rompelberg et al., 1996, Le & Franklin, 1997).

Altos níveis de GST podem ser indicativos do alto risco carcinogênico do xenobiótico ao organismo, viabilizando neste sentido o monitoramento de sua atividade para avaliar a presença de poluentes no ambiente (Vrolijk et al., 1994, Rompelberg et al., 1996). No entanto, estudos recentes demonstraram que nem sempre mudanças nas enzimas da fase II da biotransformação são seguidas por mudanças similares nas concentrações do conteúdo total de P450 (Washburn et al., 1994, Le & Franklin, 1997).

#### **4.4 –ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

A ativação do citocromo P450 através do seu ciclo catalítico envolve duas reduções monoeletrônicas do oxigênio, responsáveis por gerar a cada volta do ciclo o radical anion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Benhardt, 1995, Koblyakov, 1998). Estes dois radicais podem se unir e gerar o radical hidroxil, muito reativo e capaz de se ligar rapidamente a proteínas e ácidos nucleicos, causando danos irreversíveis ao organismo (Fridovich, 1978, Cadenas, 1989). A hipótese inicial seria a de que o aumento na atividade das enzimas antioxidantes indicaria um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio e, conseqüentemente, a ativação do citocromo P450. Com a finalidade de se monitorar a possível produção destes radicais livres do oxigênio pela fração

microssomal, determinou-se a atividade das principais enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase.

A geração de espécies reativas do oxigênio ocorre mesmo em situações nas quais o sistema microssomal hepático não está induzido. Isto é possível porque o complexo oxi-P450 (Fig. 2) é muito instável e caso o suprimento do segundo elétron não for liberado rapidamente pelo citocromo b5, o complexo pode se autooxidar liberando o radical ânion superóxido que, dismutado em peróxido de hidrogênio e na presença de ferro, pode ser reduzido a radical hidroxil (Halkier, 1996, Koblyakov, 1998, Mansuy, 1998). A NADPH citocromo P450 redutase e o citocromo b5 desempenham um papel importante na geração das espécies radicalares. A interação entre o P450 e seus doadores de elétrons ocorre na presença de alguns xenobióticos e graças aos lipídios de membrana, aumentando a eficácia do ciclo e, conseqüentemente, a geração das espécies reativas do oxigênio (Benhardt, 1995, Bayol-Denizot et al., 2000).

#### **4.4.1 – SUPERÓXIDO DISMUTASE – SOD**

Os estudos com SOD em fígados de peixes dosam a atividade desta enzima em homogeneizado total de tecido, ou seja, em diferentes compartimentos celulares, tais como núcleo, retículo endoplasmático, citossol e mitocôndria (Perez-Campo et al., 1993, Storey, 1996). Microssomas são responsáveis pela geração de radicais livres através do ciclo catalítico do citocromo P450. Comparando a atividade da SOD obtida em microssomas de *P.scrofa* com a do homogeneizado total de outros teleósteos, vimos que uma parte da atividade total da enzima está localizada em microssomas.

Os valores de atividade encontrados nas amostras controles ( $8,78 \pm 0,869$  U/mg prot., Fig.24) são menores do que aqueles comumente encontrados em outros vertebrados. Esta diferença torna-se mais aguda quando comparamos

os valores de *P.scrofa* com os encontrados em mamíferos, que são cerca de 6-7 vezes maiores do que em peixes, uma vez que estes organismos são intolerantes a variações dos níveis de oxigênio devido as suas altas taxas metabólicas. Animais pecilotérmicos, como os peixes, apresentam baixas taxas metabólicas, fazendo com que tenham concentrações menores de SOD, cuja ativação ocorrerá apenas em condições severas de estresse oxidativo, como a hipóxia e a hiperóxia (Pérez-Campo et al., 1993, Marcon, 1996, Storey, 1996, Hermes-Lima, 1998).

Os níveis de SOD no fígado de peixes variam entre as diferentes espécies. A atividade da enzima também é influenciada pela estação do ano, pela flutuação de parâmetros ambientais (temperatura, oxigênio, salinidade, etc.) e pela condição fisiológica do organismo (Aksnes & Njaa, 1981, Bathelemy et al., 1981, Fraga et al., 1996, Wilhelm-Filho, 1996, Wilhelm-Filho & Marcon, 1996, Parihar et al., 1997, Marcon & Wilhelm-Filho, 1999). Diversos estudos sobre a atividade da Superóxido Dismutase em fígado de diferentes peixes mostraram que esta enzima é mais ativa em teleósteos marinhos, apontando uma íntima relação com as características físico-químicas do meio, uma vez que o ambiente marinho favorece a produção do ânion superóxido devido à sua alcalinidade (Zafiriou, 1987, Wilhelm-Filho, 1996, Wilhelm-Filho & Marcon, 1996, Marcon & Wilhelm-Filho, 1999).

Estes resultados repetiram-se quando comparamos a atividade da SOD em *Prochilodus scrofa* com teleósteos marinhos. Enquanto no primeiro a atividade ficou em torno de  $8,78 \pm 0,869$  U/mg prot (Fig.24), no segundo ficou em torno de  $20,86 \pm 6,34$  U/mg prot. (Fitzgerald, 1992, Pérez-Campo et al., 1993), confirmando a hipótese de que a alcalinidade do ambiente marinho é responsável pela alta produção do radical ânion superóxido. Em um ambiente mais ácido, como aquele encontrado nos rios da região sudeste, a produção do peróxido de hidrogênio é favorecida, elevando às concentrações de CAT em relação a SOD (Cooper & Zika, 1983, Zafiriou, 1989, Wilhelm-Filho, 1996).

Ao incubarmos a fração microssomal com diferentes concentrações de TFP, Triton X-100 ou Tween 80, observamos um aumento pouco significativo na atividade da SOD após 20 minutos de incubação (Fig. 24C). Não foi encontrada, contudo, nenhuma relação entre a diminuição do P450 e a atividade da SOD após 20 minutos de incubação o que nos leva a supor que este dado pode estar ligado a diminuição dependente do tempo das concentrações deste citocromo na presença dos três xenobióticos.

Pedrajas (1998) e Farombi (2000) demonstraram que o tratamento com amodiaquina e dieldrin, dois xenobióticos conhecidos pelo seu alto poder oxidativo, não levaram a alterações significativas na atividade da SOD em microssomas hepáticos de camundongos e peixes, embora fossem detectadas mudanças nos níveis de P450. Isto sugere que o radical ânion superóxido pode ser proveniente de outros processos onde os níveis basais de SOD já seriam suficientes para proteger o meio dos efeitos nocivos deste radical.

Outros autores já haviam demonstrado que nem sempre a presença de um xenobiótico no meio leva ao aumento da atividade da SOD. Isto sugere que a interação dos xenobióticos estudados com proteínas ou lipídios da membrana leva a formação de outros radicais que não os derivados do oxigênio e, portanto, inacessíveis à ação da SOD (Zikic et al., 1997, Dwivedi et al., 1998, Pedrajas et al., 1998, Farombi, 2000).

Comparando o efeito de cada xenobiótico sobre a SOD vimos que em todos os casos analisados os valores de atividade encontrados ficaram em torno de 8,5 U/mg prot. (Fig.24), sugerindo que outras enzimas de defesa como a Catalase e a Glutathione Peroxidase, estariam ativadas. Isto reforça a hipótese de que haveria uma interdependência entre as três enzimas na detoxificação dos radicais livres do oxigênio (Wilhelm-Filho & Marcon, 1996, Marcon & Wilhelm-Filho, 1999).

Observou-se também uma correlação negativa entre as atividades da SOD e da CAT apenas na presença de Tween 80 ( $r=-0,6895$ ,  $p=0,0131$ ). Isto indica que nas amostras incubadas com Tween 80, o peróxido de hidrogênio pode não ser oriundo da dismutação do  $O_2^-$ , mas sim de outras fontes, como por exemplo, o  $H_2O_2$  gerado pelo ciclo do P450 e a peroxidação de membrana. Outra hipótese para esta correlação seria a inibição da atividade da CAT por este surfactante. Por outro lado, a ausência de correlação entre SOD e CAT na presença de TFP e Triton X-100 indicaria que não há uma ação conjunta entre as duas enzimas na destruição das espécies reativas do oxigênio. Embora o Tween 80 também seja um surfactante capaz de desestabilizar a estrutura membranas, seu poder lítico é menor que o do Triton X-100; desde modo o Tween 80 estaria causando menos danos á membrana e as proteínas embebidas nesta.

O  $H_2O_2$  gerado pela dismutação do  $O_2^-$  pela Superóxido. Dismutase pode ser detoxificado tanto pela CAT quanto pela GPX, de modo que uma correlação positiva entre a SOD e a GPx indicaria o papel desta peroxidase em atacar o  $H_2O_2$  gerado pela SOD. Novamente, só foi observada uma correlação negativa entre SOD e GPx em microsomas tratados com Tween 80 ( $r=-0,832$ ,  $p=0,0104$ ), confirmando a hipótese de que o  $H_2O_2$  não se origina da dismutação do  $O_2^-$ . E, na mesma direção, nenhuma relação foi observada entre as duas enzimas na presença de TFP e Triton X-100.

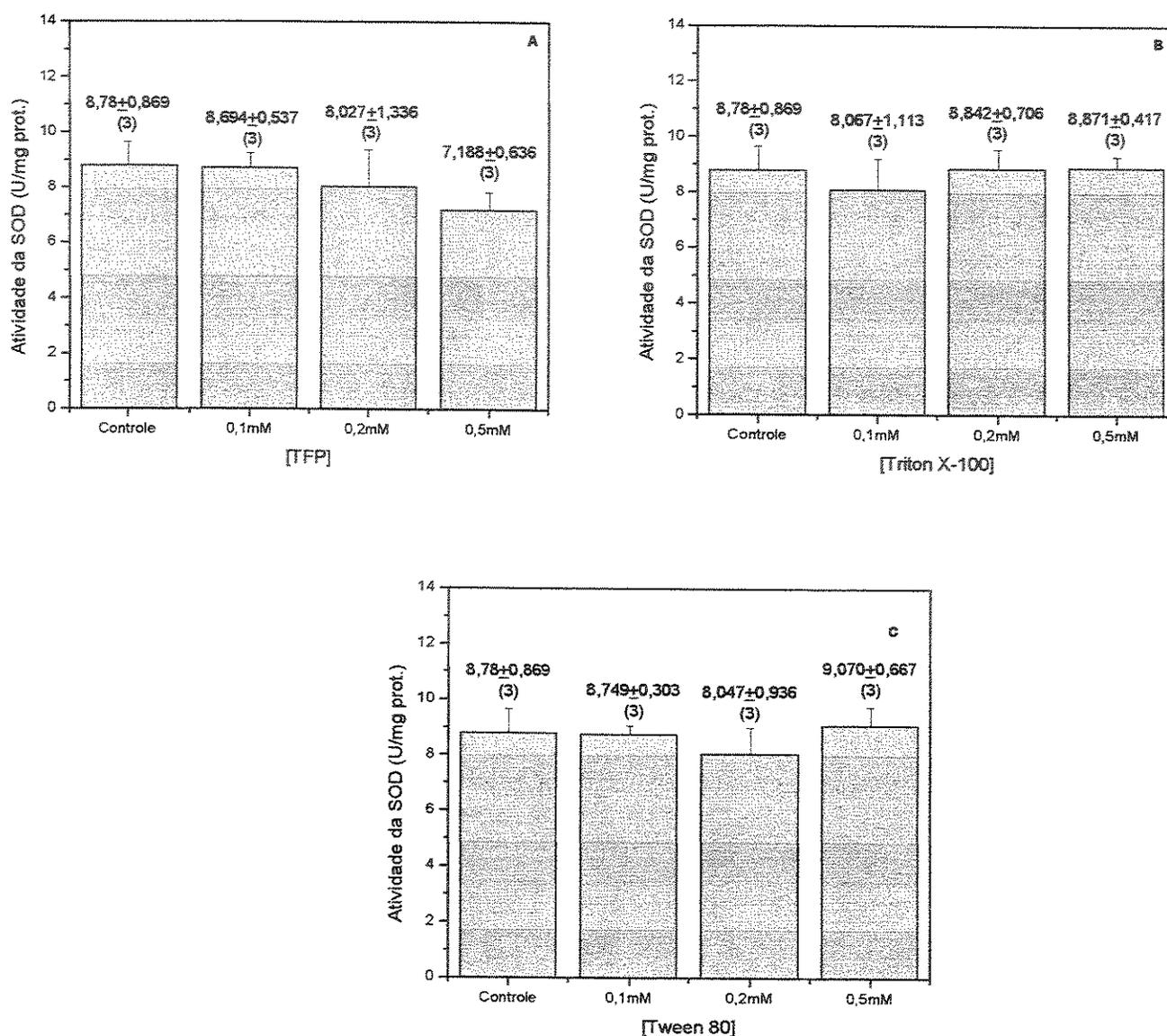


Fig. 24 – Efeito de xenobióticos na atividade da Superóxido Dismutase. A atividade da Superóxido dismutase – SOD (U/mg prot.) foi determinada em microsomas de *Prochilodus scrofa* (0,2mg/ml) após 20 minutos de incubação com diferentes concentrações dos xenobióticos. (A) TFP, (B) Triton X-100, (C) Tween 80. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O valor entre parêntese significa o número de amostras analisadas. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

Nas suspensões microsossomais tratadas com diferentes concentrações de TFP, a atividade da SOD permaneceu inalterada. Estes dados confirmam estudos anteriores sobre o poder antioxidante da TFP e outros compostos

nitroheterocíclicos em membranas biológicas, nos quais os níveis basais de SOD já seriam suficientes para deter os danos causados pelos radicais livres do oxigênio (Beales & McLean, 1996, Mitchelmore et al., 1996). No caso das suspensões tratadas com Triton X-100 a desestabilização que este surfactante provocou na membrana pode ter sido responsável pela ausência de correlação entre a SOD e as outras enzimas antioxidantes.

#### **4.4.2 – CATALASE - CAT**

Assim como já observado na SOD, a atividade da CAT nas amostras controles de *Prochilodus scrofa* ( $24,462 \pm 2,295$  pmoles/mg prot., Fig.25) foram menores do que aquelas observadas em outros vertebrados (Perez-Campo et al., 1993, Boveris & Bermudez, 1996, Storey, 1996). A principal razão para esta diferença marcante é o fato de que peixes detoxificam o peróxido de hidrogênio não só através da CAT, mas também eliminando  $H_2O_2$  através das brânquias, órgão especializado na troca gasosa que apresenta uma alta vascularização e uma fina e extensa camada de células responsáveis pela difusão deste composto do organismo para o ambiente (Boveris & Bermudez, 1996, Olson, 1998, Wilhelm-Filho et al., 1999).

Os valores microssomais de atividade da CAT correspondem a aproximadamente 3,8% da enzima presente no fígado de peixes. Esta baixa representatividade está relacionada com a localização celular da CAT que é encapsulada nos peroxissomos, descartados na primeira centrifugação da preparação para o isolamento dos microssomas (Alberts et al., 1994).

Diferentemente do observado com a SOD, cada xenobiótico causou um efeito diferente na atividade da CAT, como podemos observar na Figura 25. A TFP levou à diminuição estatisticamente não significativa na atividade da CAT, como podemos observar na Figura 25A. Estes dados confirmam também a

hipótese do efeito protetor da TFP sobre a oxidação de membranas biológicas e a possível interação da TFP com os componentes do SMH, alterando o ciclo catalítico do citocromo P450 e a produção de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Beales & McLean, 1996, Mitchelmore et al., 1996).

A presença de Triton X-100 na suspensão microssomal levou ao aumento da atividade da CAT proporcional ao aumento da concentração do xenobiótico (Fig. 25B). Infere-se, assim, que a presença de  $H_2O_2$  no meio não é dada pelo ciclo catalítico do P450, pois este citocromo encontra-se destruído. A correlação encontrada entre os níveis de P450 e a atividade da CAT não foi muito significativa, sugerindo que estas duas proteínas não têm atividades dependentes e confirmando, portanto, a hipótese acima descrita.

O Tween 80, ao contrário do Triton X-100, levou à diminuição da atividade da CAT (Fig. 25C), estando de acordo com a correlação negativa apresentada entre esta enzima e a SOD. Foi observada ainda uma correlação positiva entre os níveis de P450 e a atividade da CAT ( $r = 0,6588$ ,  $p = 0,0198$ ), indicando que a inibição do P450 é acompanhada pela inibição da CAT.

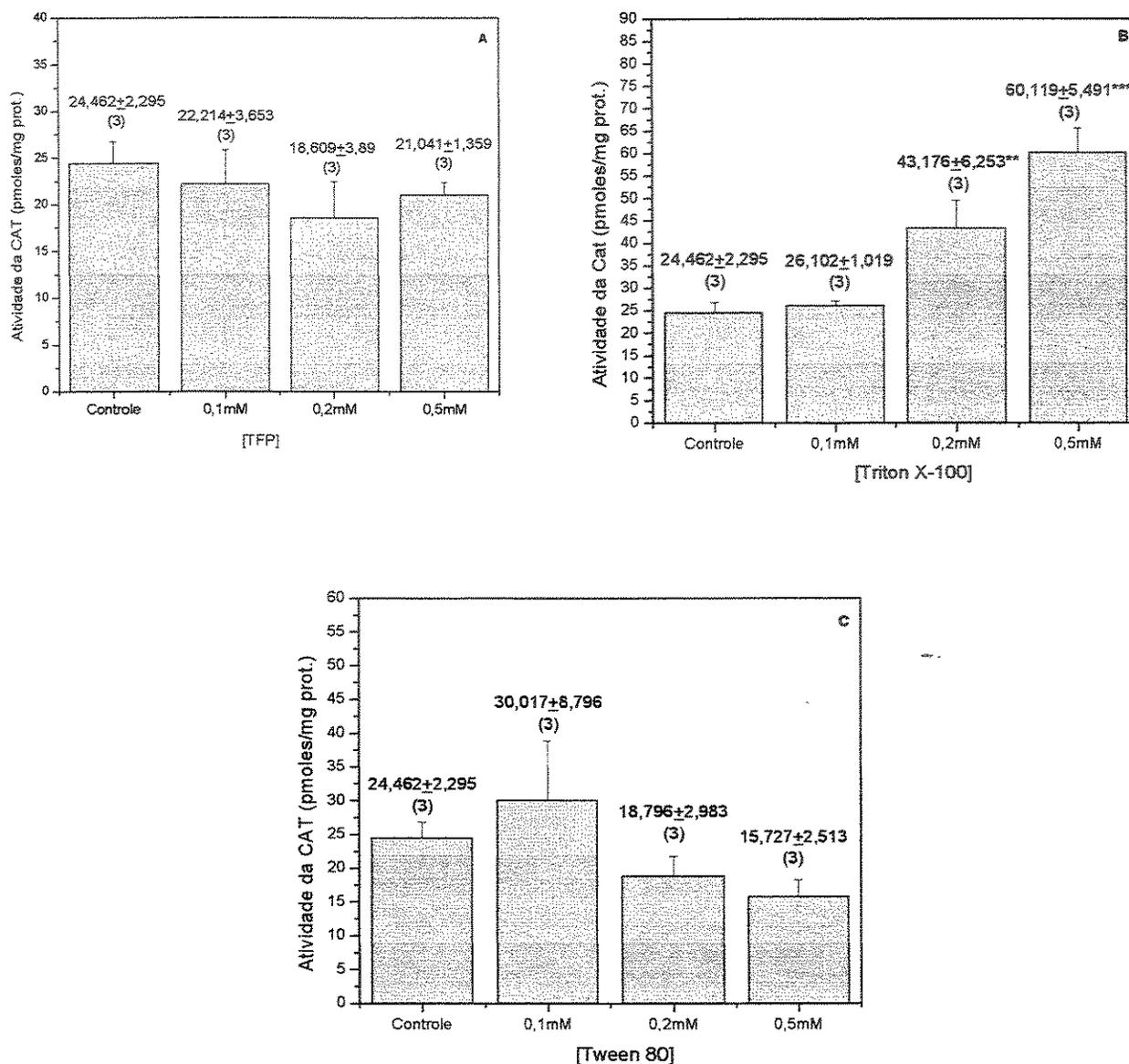


Fig. 25 – Efeito dos xenobióticos na atividade da Catalase. A atividade da Catalase – CAT (pmoles/mg prot.) foi determinada em microsomas de *Prochilodus scrofa* 0,2mg/ml após 20 minutos de incubação com os xenobióticos estudados. (A) TFP, (B) Triton X-100, (C) Tween 80. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O valor entre parênteses significa o número de amostras analisadas. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle, \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

Analisando conjuntamente a influência dos dois surfactantes na atividade da CAT em suspensão microsomal, pudemos perceber que a atuação dos dois xenobióticos é marcada por algumas diferenças. No caso do Triton X-

100, o aumento progressivo da atividade está ligado às características químicas da molécula e não ao seu poder oxidativo. A adição deste surfactante na suspensão microsomal criaria um ambiente hidrofóbico, devido à formação de micelas mistas, aumentando a especificidade do substrato e a estabilidade da proteína, tendo como consequência direta o aumento da atividade da CAT por formar pequenos agregados da enzima encapsulados em micelas – que é um ambiente mais propício à atividade da CAT devido a sua baixa afinidade pelo substrato (Jene et al., 1997, Sekhar et al., 1999, Matés, 2000).

Em seguida, o aumento da concentração de Tween 80 no meio levou à diminuição da atividade da CAT, confirmando a correlação negativa entre esta enzima e a SOD, o que poderia estar indicando uma provável inibição da enzima. A inibição da Catalase é concomitante à diminuição do P450, sugerindo que ambos podem estar sofrendo a ligação do surfactante no grupo heme, comum a ambas proteínas. As taxas de peroxidação lipídica na presença de Tween 80 também não se alteraram em relação ao controle (ver resultados adiantes, Fig.27), confirmando que este processo não é responsável pela destruição do P450 e que este surfactante causa menos danos à membrana do que o Triton X-100.

O aparente aumento da SOD e da Glutathione Peroxidase seguidos pela diminuição dos níveis de atividade da CAT sugerem que o acúmulo de  $O_2^-$ , em decorrência das baixas atividades da SOD, estaria inibindo a CAT já que este radical é pequeno o suficiente para acessar o grupamento heme da enzima e convertê-la para os estados ferroxil e ferril, suas formas inativas (Kono & Fridovich, 1982, Puntarulo & Cederbaum, 1996, Wilhelm-Filho e Marcon, 1996, Dwivedi et al., 1998, Jewett et al., 1999, Farombi, 2000).

#### **4.4.3 – GLUTATIONA PEROXIDASE - GPx**

A Glutationa Peroxidase (GPx) é uma enzima que têm uma atividade complementar à da CAT na detoxificação do  $H_2O_2$ . Além disto, esta enzima também é muito atuante na detoxificação de peróxidos orgânicos produzidos pela membrana celular (Cadenas, 1989, Pérez-Campo et al., 1993, Storey, 1996, Arun et al., 1999). Esta dualidade de funções explicaria a alta atividade da GPx encontradas ainda nas amostras controle ( $149,16 \pm 10,918$  pmol/mg prot, Fig. 26) e estaria ligada à distribuição da enzima na célula. Enquanto a CAT está localizada predominantemente nos peroxissomos, a GPx encontra-se ligada à membrana de várias organelas, dentre elas o retículo endoplasmático, já que atua na detoxificação dos hidroperóxidos produzidos pela peroxidação lipídica (Flohé & Gunzler, 1984, Alberts et al., 1994).

Dentre os vertebrados, foi observado que em animais pecilotérmicos a atividade da GPx é menor do que em homeotérmicos, confirmando que animais com taxas metabólicas maiores estão mais susceptíveis aos danos causados pelas espécies reativas do oxigênio, e por isso necessitam de defesas mais efetivas contra estas espécies radicalares (Anders & Njaa, 1981, Pérez-Campo et al., 1993, Storey, 1996, Hermes-Lima et al., 1998, Arun et al., 1999).

Analisando separadamente o efeito de cada um dos xenobióticos sobre a atividade da GPx, pudemos observar que eles atuam de maneira distinta (Fig. 26). Novamente a TFP não levou à nenhuma alteração estatisticamente significativa na atividade da GPx (Fig. 26A). Foi observada uma correlação negativa entre o P450(SRNADPH) e a GPx ( $r = -0,7223$ ,  $p = 0,043$ ), indicando que os radicais atacados por esta enzima não provêm do ciclo catalítico do P450. Como esta relação só foi observada nos microssomas com SRNADPH, podemos inferir que os hidroperóxidos atacados pela GPx são oriundos da peroxidação lipídica da membrana induzida pelo NADPH (Storey, 1996).

A presença do Triton X-100 levou ao aumento da GPx concomitantemente ao da CAT. Não foi encontrada nenhuma correlação entre as duas enzimas, indicando que elas não agem em conjunto (Fig. 26B). Neste caso, foi observada uma correlação negativa entre o P450 e a GPx ( $r = -0,8637$ ,  $p = 0,0057$ ), confirmando que os hidroperóxidos atacados pela GPx não são gerados pelo ciclo catalítico do P450, uma vez que este citocromo foi destruído pelo surfactante após 20 minutos de incubação.

Ao contrário do observado com a TFP, não podemos inferir que tais hidroperóxidos sejam gerados pela peroxidação lipídica da membrana na presença do Triton X-100, pois se supõe que este surfactante está provocando a destruição da membrana microssomal (Oteiza et al., 1993, Ohyshiki et al., 1998). Assim, este aumento da GPx, tal como observado com a CAT, está ligado não só ao poder oxidativo do xenobiótico, mas à formação de agregados entre a enzima e as moléculas de surfactante, aumentando a atividade e a especificidade pelo substrato devido à criação de um ambiente apolar (Jene et al., 1997, Sekhar et al., 1999). Embora os três xenobióticos tenham características surfactantes e estejam sendo usados em concentrações acima da CMC, o Triton X-100 causa muito mais danos à membrana microssomal do que a TFP e o Tween 80. A TFP não causaria tantos danos a membrana por estar sendo parcialmente metabolizada pelo sistema, o que diminui a concentração de droga livre e capaz em interagir com a membrana microssomal. Já o Tween 80 causa a deslipidação da membrana em menores taxas devido às suas características estruturais tais como a grande cabeça apolar, comparadas à do Triton X-100, e a disposição das suas cadeias de PEG, impede sua inserção completa na membrana, diminuindo a formação de micelas (de Foresta et al., 1989).

A baixa atividade da CAT observada na presença de Tween 80 é compensada pela alta atividade de GPx (Fig. 26C), ainda que a correlação observada entre as duas enzimas seja estatisticamente não significativa. Foi observada uma correlação negativa entre os níveis de P450 e a atividade da GPx

em microssomas tratados com Tween 80 na presença de SRNADPH ( $r = -0,7982$ ,  $p = 0,0176$ ). Estes dados podem estar indicando que a destruição do P450 não é acompanhada pela destruição da GPx, inferindo-se que o radical ânion superóxido, responsável pela inibição da CAT, não atinge a GPx, explicando, portanto, a correlação negativa entre SOD e GPx e que os hidroperóxidos produzidos não são oriundos do ciclo do P450, já que o conteúdo deste se encontra diminuído, mas sim de outros processos oxidativos, provavelmente da peroxidação lipídica (Kono & Fridovich, 1982, Benhardt, 1995, Farombi, 2000).

É conhecido que o  $H_2O_2$  pode ser destruído tanto pela GPx quanto pela CAT, esta última atuando na remoção de hidroperóxidos em altas concentrações, enquanto que a GPx estaria removendo-o em situações de equilíbrio. A situação encontrada nos experimentos analisados com Tween 80 sugere que o tratamento dos microssomas com este xenobiótico pode levar ao acúmulo de peróxido de hidrogênio e agravar o quadro de estresse oxidativo. A ativação da GPx seria uma resposta do organismo para evitar que sejam desenvolvidos danos na membrana microssomal induzidos pelo peróxido de hidrogênio, uma vez que a ausência da CAT pode deixar a membrana mais susceptível a este tipo de estresse (Wilhelm-Filho & Marcon, 1996, Dwivedi et al., 1998, Farombi et al., 2000).

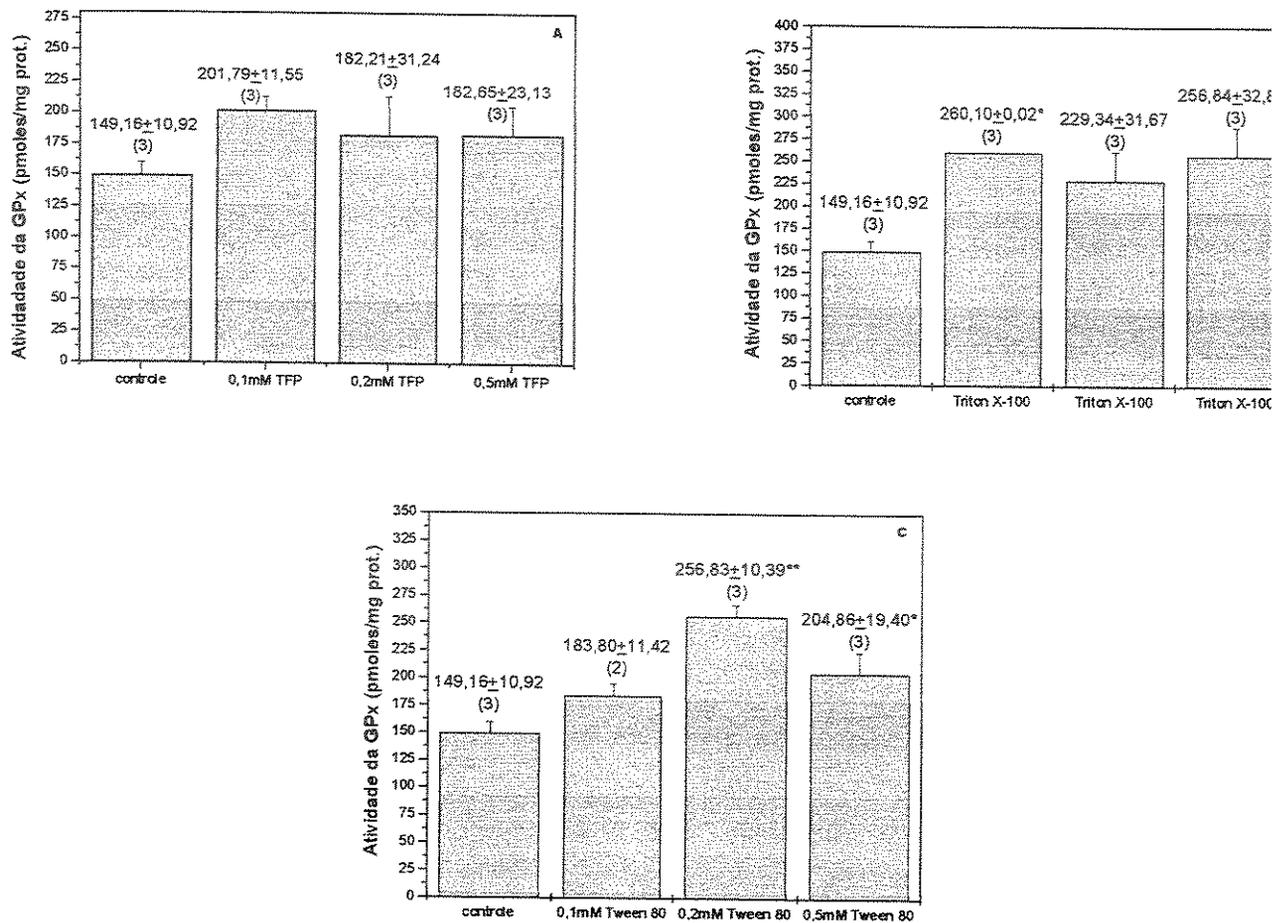


Fig. 26 – Efeito de xenobióticos na atividade da Glutathiona Peroxidase. A atividade da Glutathiona Peroxidase – GPx (pmoles/mg prot.) foi determinada em microsomas de *Prochilodus scrofa* (0,1mg/ml) após 20 minutos de incubação com diferentes xenobióticos, TFP (A), Triton X-100 (B), Tween 80 (C). Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão e o valor entre parênteses significa o número de amostras analisadas. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle, \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle. Os experimento foram feitos em triplicatas.

A análise conjunta das três enzimas antioxidantes e suas possíveis correlações com os níveis de P450 nas condições estudadas levaram à conclusão de que não há uma forte correlação entre o sistema P450 e o sistema antioxidante, mostrando que o uso de enzimas antioxidantes como mais uma ferramenta de biomonitoramento têm que ser cautelosa, uma vez que a sua atividade pode ser modulada por diversos fatores ambientais, fisiológicos e físico-químicos do ambiente e do organismo sentinela.

#### **4.5 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA**

Em suspensões microssomais tratadas com Triton X-100 não foi possível detectar a formação dos radicais peroxil (LOO·) pelo método do ácido tiobarbitúrico na presença e na ausência de SRNADPH. Estudos anteriores demonstraram que a presença deste surfactante no meio em concentrações superiores a 0,1% (v/v) levava a alterações bruscas na membrana que culminam por rompê-la, impedindo assim a formação dos radicais peroxil. Isto indica que a integridade da membrana é indispensável para que a droga exerça seu efeito oxidativo e o processo de peroxidação lipídica ocorra (Oteiza et al., 1993, Ohyashiki et al., 1998, le Maire et al., 2000). Estes resultados confirmam, portanto, a hipótese de que o Triton X-100 causa a destruição da membrana microssomal e, conseqüentemente, a inativação do P450, cuja atividade é dependente da organização dos fosfolipídios do meio.

A presença de NADPH elevou a concentração de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas. Embora a diferença não seja estatisticamente significativa, ela demonstra que o cofator é responsável pelo aumento das taxas de peroxidação lipídica, o que pode estar ligado à presença de isoforma CYP1A, predominante no tecido hepático de peixes, capaz de completar o ciclo do P450 mesmo na ausência de substrato ("futile cycle") e, portanto, a maior consumidora de NADPH, aumentando o número de reações oxidativas e, por conseqüência, levando à geração de hidroperóxidos capazes de iniciar os processos peroxidativos e também de destruir o citocromo P450 (Puntarulo & Cederbaum, 1998, Re et al., 1999).

A presença da TFP e do Tween 80 na suspensão microssomal provocou alterações na taxa de formação dos produtos da peroxidação lipídica como podemos observar na Figura 27.

A TFP diminuiu as taxas de peroxidação da membrana microssomal na ausência de SRNADPH (Fig. 27A). O efeito protetor da TFP condiz com os dados já demonstrados com as enzimas antioxidantes. A proteção exercida pela droga estaria ligada a propriedade da TFP em inibir a hidrólise de fosfolípidios através da inibição da Fosfolipase A<sub>2</sub>, mantendo assim a integridade da membrana (Levin et al., 1973, Beales & McLean, 1996, Spiteller, 1996, Puntarulo & Cederbaum, 1998). Na presença de SRNADPH e de TFP houve um aumento das taxas de peroxidação lipídica nos microssomas de *Prochilodus scrofa*, confirmando que este cofator aumenta as taxas de peroxidação lipídica mesmo na presença da TFP que, como demonstrado acima, protege a membrana dos efeitos da peroxidação lipídica.

Foi observada uma correlação negativa entre os níveis de GPx e TBARS (+) ( $r = -0,9209$ ,  $p = 0,0012$ ) na presença de TFP, indicando que esta enzima não participa da manutenção da integridade da membrana contra os danos causados pelo peroxidação lipídica induzida pelo NADPH. Não foi encontrada nenhuma relação entre os níveis de P450 e de TBARS, confirmando que a diminuição do conteúdo deste citocromo não é dada pelo aumento dos produtos de peroxidação da membrana e sugerindo que a biotransformação da TFP e a peroxidação lipídica são eventos desvinculados devido ao efeito protetor da droga sobre as membranas microssomais.

A ausência de uma resposta das enzimas antioxidantes à presença da TFP nas suspensões microssomais e a diminuição dos níveis de peroxidação lipídica podem indicar que este xenobiótico estaria prevenindo os danos causados pela geração de espécies reativas do oxigênio. Enquanto os níveis basais da atividade das enzimas antioxidantes seriam suficientes para lidar com qualquer mudança nas taxas de produção de radicais livres gerados pela TFP, este xenobiótico também estaria protegendo a membrana dos processos de peroxidação lipídica por impedir a ação das fosfolipases sobre os lipídios de membrana.

A presença de Tween 80 não causou alterações perceptíveis nos níveis de peroxidação lipídica, na presença ou ausência de SRNADPH, como podemos observar na Figura 27B. As concentrações usadas nos experimentos foram sempre superiores à CMC do Tween 80, ou seja, estaria ocorrendo a formação de micelas e fazendo com que este surfactante, um derivado do ácido oléico, passasse a fornecer ácido graxos monoinsaturados, que não são bons substratos para a formação de radicais derivados do malonaldeído nos processos de peroxidação lipídica da membrana devido ao baixo número de insaturações (Ohkawa et al., 1979, Kapich et al., 1999). Novamente, não foi encontrada nenhuma correlação entre os níveis de P450 e TBARS, sugerindo que este processo não é o principal responsável pela destruição do P450 na presença de Tween 80.

A incubação das suspensões microsossomais com Tween 80 na ausência de SRNADPH mostrou que este xenobiótico não apresentou efeito protetor, pois os valores encontrados foram maiores do que os da TFP. Na presença de SRNADPH os níveis de peroxidação lipídica com TFP e com Tween 80 não se diferenciaram muito daqueles do controle, indicando que a peroxidação lipídica induzida por NADPH não é a única responsável pela destruição do citocromo P450. Esta hipótese é reforçada pela ausência de uma correlação entre a concentração de P450 e os níveis de TBARS.

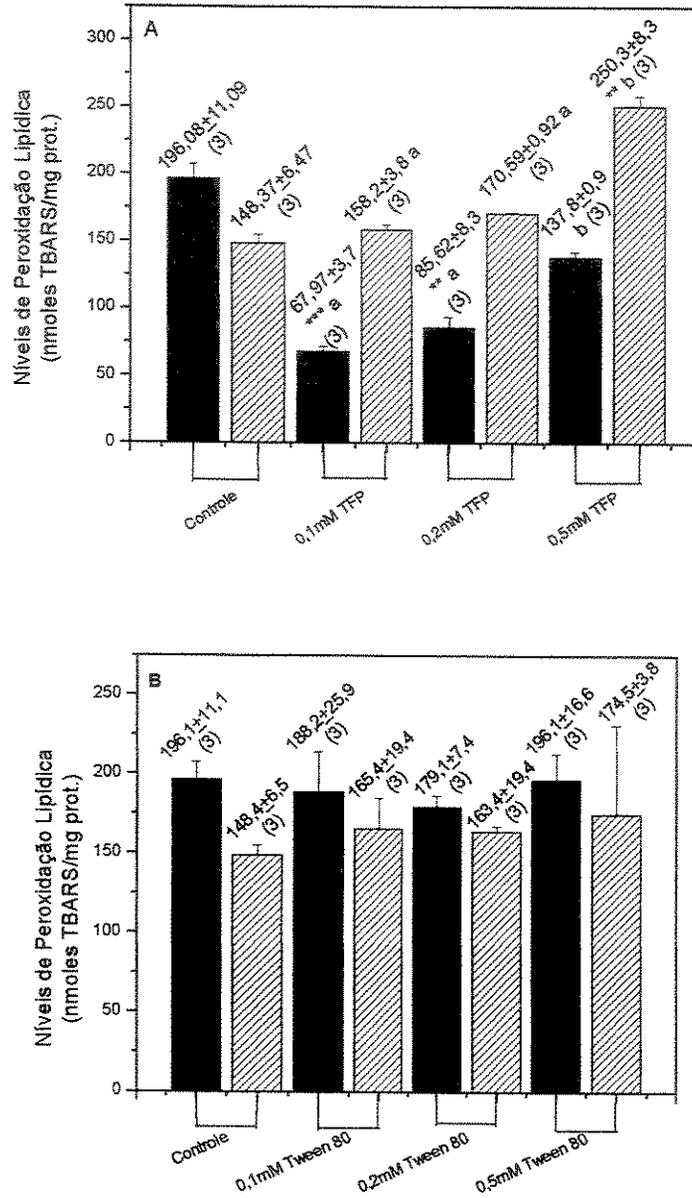


Fig. 27 – Efeito dos xenobióticos na peroxidação lipídica. Os níveis de peroxidação lipídica em microsomas de *Prochilodus scrofa* (0,5mg/ml) após 20 minutos de incubação com TFP (A) e Tween 80 (B) na ausência (coluna cheia) e na presença (coluna hachurada) de Sistema regenerador de NADPH. Os dados são expressos em nmoles/mg prot. e representam a média  $\pm$  desvio padrão da média. Todas as amostras foram feitas em triplicatas. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle, a  $p < 0,05$  e b  $p < 0,01$  em relação à ausência de SR.

Os valores de peroxidação lipídica em microssomas de *Prochilodus scrofa* foram semelhantes àqueles observados para outros vertebrados, indicando a alta capacidade oxidativa do tecido hepático (Marcon, 1996, Storey, 1996, Junqueira et al., 1997, Dwivedi et al., 1998, Hermes-Lima et al., 1998, Farombi, 2000). Os valores de peroxidação lipídica podem variar segundo o substrato analisado. Nos ensaios realizados analisou-se somente a formação de aldeídos capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico. No entanto, outros radicais, como os dienos e o isobutanol, poderiam estar sendo formados e não foram detectados pelo método empregado (Storey, 1996).

#### **4.6 – DETECÇÃO DAS ISOFORMAS DO CITOCROMO P450 E OS EFEITOS CAUSADOS PELOS XENOBIÓTICOS ESTUDADOS EM CADA UMA DELAS.**

As isoformas CYP1A e CYP2B foram identificadas pelo método enzimático, segundo o qual a atividade de cada isoforma é determinada medindo-se a fluorescência do produto formado, a resorufina. Este método não é indicado para detectar a presença de isoformas quando em baixas concentrações, tornando-se necessário então o uso de sondas mais sensíveis como, por exemplo, técnicas de hibridação com anticorpos específicos. Microssomas hepáticos de *Prochilodus scrofa* possuem apenas a isoforma CYP1A, não tendo sido detectada a presença do CYP2B, pois não houve o aumento da intensidade da fluorescência em 585 nm, referente ao produto da reação, a resorufina (Fig.28).

A ausência da CYP2B é comumente observada em fígado de outras espécies de peixes, onde as isoformas mais abundantes são a CYP1A e CYP3A, ainda que em fígado de mamíferos a CYP2B seja encontrada mesmo na ausência de xenobióticos (Washburn et al., 1994, Buhler & Wang-Buhler, 1998, Goksøyr & Husøy, 1998, Machala et al., 1998, Longo et al., 2000).

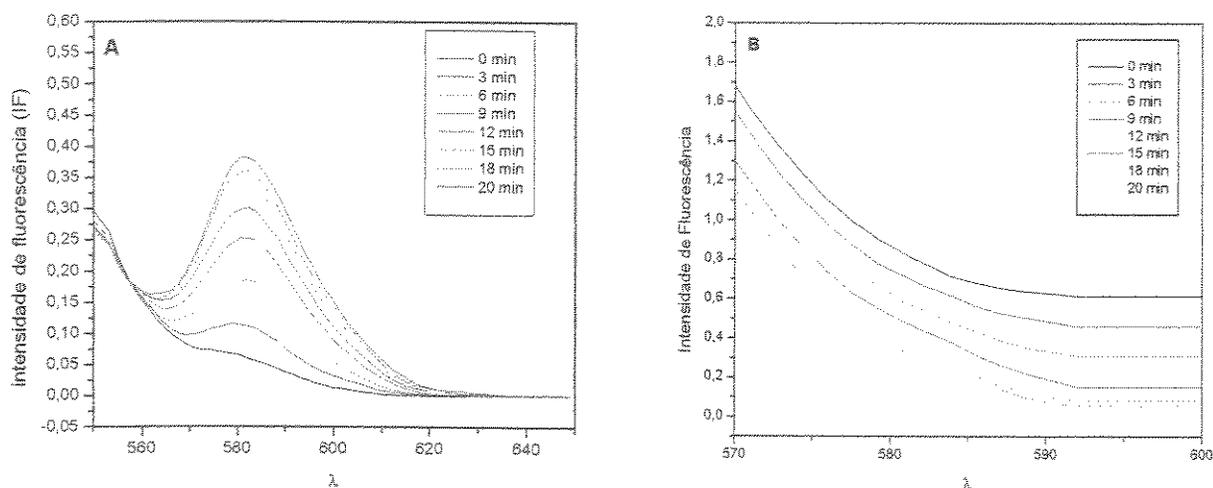


Fig. 28 – Detecção da CYP1A e CYP2B por fluorescência. A intensidade de fluorescência foi medida em microssomas de *Prochilodus scrofa* (1,0 mg/ml) em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4 (Excitação - 530nm, Emissão - 580nm) para a detecção das isoformas CYP1A (A) e CYP2B (B).

Peixes apresentam como isoforma predominante do citocromo P450 a CYP1A, induzida pela maioria dos xenobióticos, como os compostos aromáticos (policíclicos aromáticos, os policíclicos bifenis) e as dioxinas. Já a CYP2B – cujos principais indutores são os barbiturados, DTTs, etc, não é encontrada com tanta frequência no tecido hepático, chegando a apresentar concentrações 25 vezes menores que a CYP1A, o que exige o uso de métodos mais sensíveis do que o fluorimétrico para detectar essa isoforma (Ueng et al., 1995, Buhler & Wang-Buhler, 1998, Goksøyr & Husøy, 1998).

Na presença de cada um dos três xenobióticos estudados também não foi possível detectar a ativação da isoforma CYP2B, o que nos leva a supor que a isoforma pode estar presente em baixíssimas concentrações e, portanto, menos sensível à ativação, ou então que tais xenobióticos poderiam estar atuando como seus inibidores (Soucek et al., 1994, Connor et al., 1995, Fent et al., 1998, Tateishi et al., 1999, Yanev et al., 2000).

A ativação da CYP1A é um sinal de exposição química e dos efeitos biológicos que um dado xenobiótico pode provocar ao organismo. Carcinogênese química e toxicidade associada à ativação desta isoforma fazem dela um biomarcador em potencial no campo da toxicologia aquática devido a sua sensibilidade (Vrolijk et al., 1994, Goksøyr & Husøy, 1998, Au et al., 1999). Como podemos observar na Figura 29, cada xenobiótico interfere de uma maneira diferente na atividade da isoforma CYP1A. Mesmo na ausência de qualquer xenobiótico é possível identificar altas taxas de ativação da CYP1A; isto é possível não só porque esta é a isoforma mais abundante no tecido hepático, mas também porque esta é a única isoforma capaz de realizar o ciclo da monooxigenação mesmo na ausência de substrato.

A presença da TFP (Fig.29A) nas suspensões microsossomais levou ao aumento da atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), detectada através do aumento das intensidades de fluorescência. Estes resultados são opostos àqueles observados na literatura, onde os compostos nitroaromáticos, como a TFP, são apontados comumente pela sua capacidade de inibir a isoforma CYP1A (Murray, 1992, Livingstone et al., 1992, Mitchelmore et al., 1996, Tateishi et al., 1999). Após 20 minutos de incubação observou-se uma correlação negativa entre os níveis totais de P450 e a ativação da EROD ( $r=-0,9049$ ,  $p=0,002$ ), mostrando que a ativação da CYP1A não foi acompanhada pelo aumento do conteúdo do P450 total. Estes dados confirmam a hipótese já levantada de que compostos nitroaromáticos, como a TFP, levam à diminuição seletiva de algumas isoformas do citocromo P450 (Fent & Stegeman, 1991, Fent & Bucheli, 1994, Halpert, 1995, Fent et al., 1998).

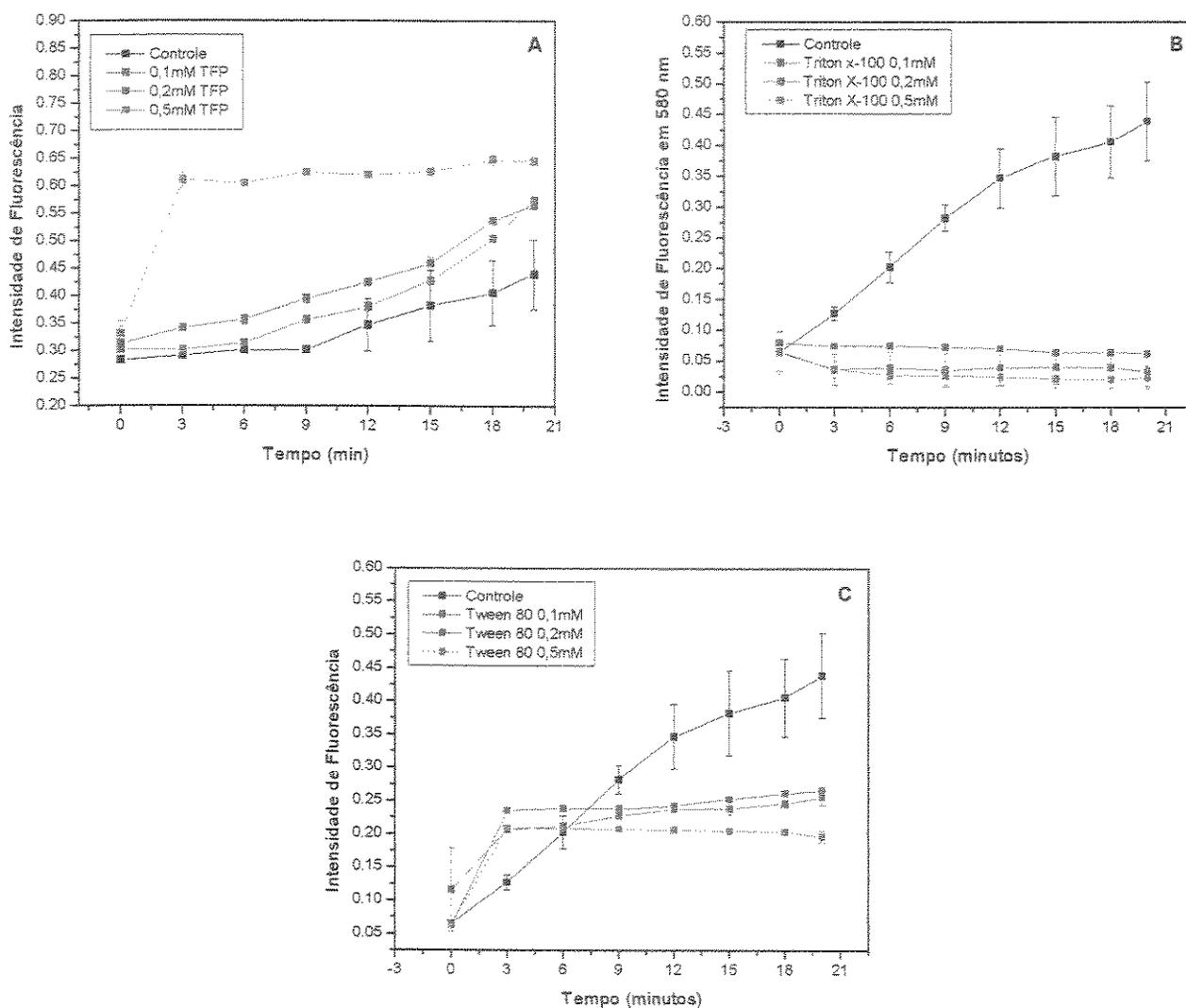


Fig. 29 – Efeito do tempo na ativação da CYP1A. A Ativação da isoforma CYP1A foi determinado em microsomas de *Prochilodus scrofa* (1,5 mg/ml) tratadas com diferentes concentrações dos xenobióticos estudados, TFP (A), Triton X-100 (B) e Tween 80 (C). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente (Excitação - 530nm, Emissão - 580nm). Controle – amostra sem xenobiótico.

Os resultados encontrados indicam que a CYP1A estaria sendo ativada pela presença do xenobiótico. Neste sentido, a TFP estaria sendo metabolizada pelo sistema P450 e os seus metabólitos nitrosos, hábeis em interagir com o sítio ativo da proteína, seriam responsáveis, portanto, pela inibição de todo sistema (Lange et al., 1992, Vrolijk et al., 1994, Halpert, 1995, Longo et al., 2000).

O Triton X-100 não levou à ativação da CYP1A, uma vez que não foi detectada qualquer alteração na intensidade de fluorescência nas amostras tratadas com diferentes concentrações do xenobiótico (Fig. 29B). Foi encontrada uma forte correlação entre os níveis de P450 total e os de EROD (CYP1A) ( $r=0,9783$ ,  $p<0,0001$ ), indicando a destruição de diferentes isoformas do P450 e confirmando a hipótese de que este xenobiótico estaria interagindo tanto com a proteína quanto com o ambiente lipídico através da formação de micelas e levando à perda da atividade catalítica.

A presença do Tween 80 levou ao comportamento bifásico da EROD (Fig.29C) semelhante àquele observado no citocromo P450 (Fig.18). A adição da droga estaria promovendo uma ativação da CYP1A, dada pelo aumento na intensidade de fluorescência. Depois de 6 minutos de incubação ocorreu a destruição da isoforma CYP1A, representado pela ausência de alterações na intensidade de fluorescência. Tal como observado com o Triton X-100, o comportamento apresentado pelo Tween 80 confirma a hipótese de que este xenobiótico causaria a inibição dependente do tempo e da concentração por interagir com ambiente lipídico da membrana. A alta correlação encontrada entre os níveis de P450 total e EROD (CYP1A) ( $r=0,9416$ ,  $p=0,0005$ ), indicam a destruição do P450 total acompanhada pela destruição da isoforma CYP1A após 20 minutos de incubação. Estes surfactantes parecem interagir diretamente com a proteína e com os lipídios da membrana destruindo a atividade catalítica das diferentes isoformas que compõem o sistema P450 (Fent & Stegeman, 1991, Fent & Bucheli, 1994, Fent et al., 1998).

Podemos concluir, portanto, que o Triton X-100 e o Tween 80 destroem completamente o P450 após 20 minutos de incubação, enquanto que a TFP leva à ativação da isoforma CYP1A concomitante à inibição de outras isoformas do P450.

A Trifluoperazina foi o único xenobiótico a ser metabolizado pelo

sistema P450, pois apresentou a ativação das enzimas EROD (CYP1A), NADPH citocromo P450 redutase, representantes da fase I do processo de biotransformação e da enzima Glutathiona – S- Transferase (enzima da fase II). Ao se ligar ao P450, a TFP estaria num primeiro momento ativando a isoforma CYP1A, sugerindo a ativação do receptor Ah (aryl hidrocarbon) em processos *in vivo* e, num segundo momento, este xenobiótico estaria inibindo outras isoformas do P450 presentes em microssomas de *Prochilodus scrofa*. Isto explica, também, o fato de que mesmo estando em concentrações acima da CMC, os efeitos da TFP na membrana serem menores do que dos outros xenobióticos (Triton X-100 e Tween 80) já que esta droga estaria sendo rapidamente metabolizada pela isoforma CYP1A.

#### **4.7 – ANÁLISE DOS RESÍDUOS DE TRIPTOFANO (Trp)**

Quando a suspensão microssomal foi incubada com diferentes concentrações de TFP, foi possível observar uma “supressão” de fluorescência, sugerindo que os resíduos de Trp estariam expostos a um ambiente mais polar (Fig.30A) (Ruggieiro & Meirelles, 1998).

O aumento das concentrações de TFP provocou o deslocamento do pico de 330 nm para a faixa do vermelho, em 470nm (Fig.30A, pico II). Este deslocamento da emissão estaria ligado tanto à transferência de energia da TFP para o Trp (Ruggiero & Meirelles, 1998) quanto à formação de um complexo entre a TFP, ou seu metabólito (TFPNO), e o citocromo P450 (Guengerich, 1997). A formação deste complexo foi observada na Figura 12C através do deslocamento do pico de 450 para 455 nm, Os dados obtidos com a análise dos picos de triptofano fortalecem a hipótese já levantada de que a TFP estaria sendo parcialmente metabolizada e o P450 teria sua ação inibida devido ao metabólito nitroso formado durante o processo de biotransformação.

Uma das conseqüências da formação deste complexo seria a exposição do resíduo do Trp à fase aquosa. Estes eventos ocorrem porque em pH 7,4 a TFP encontra-se parcialmente protonada facilitando sua ligação com a proteína e, também, com os lipídios da membrana, expondo a porção hidrofóbica de alguns componentes do SMH (Ruggiero & Meirelles, 1998).

A presença do Triton X-100 levou ao aumento da intensidade de fluorescência do Triptofano, indicando uma mudança conformacional do meio. É possível que isto esteja indicando a exposição do resíduo a um ambiente mais apolar, isto é, englobado por micelas formadas pelo surfactante e fosfolipídios de membrana, sustentando a hipótese da formação de um ambiente mais apolar pelo Triton X-100, como já foi discutido anteriormente (Fig. 30B).

O Triton X-100 é um bom solubilizador de membrana por provocar a deslipidação, ou seja, a substituição de lipídios endógenos por moléculas do surfactantes. No entanto estes fosfolipídios liberados, em especial a fosfatidilcolina, não são hábeis em formar micelas e, portanto, se ligam na superfície hidrofóbica da proteína com muito mais afinidade que o surfactante, formando, assim, um "pool" de lipídios ao redor da proteína, restringindo-a um ambiente mais hidrofóbico dado pela diminuição da supressão de fluorescência do Triptofano (de Foresta et al., 1989).

O Tween 80 interage com os resíduos de Trp expondo-os a um ambiente mais polar, ou seja, mais hidrofílico; um comportamento semelhante a aquele observado com a TFP (Fig.30C). A "supressão" de fluorescência ocorreu de maneira mais gradual do que foi observado com TFP. Além disso, o tratamento com Tween 80 não levou ao deslocamento do pico de 330nm, indicando um menor grau de transferência de cargas do xenobiótico para os componentes protéicos do SMH, pois como o surfactante é não iônico, sua carga não foi alterada pelo pH do meio (Attwood & Florence, 1983).

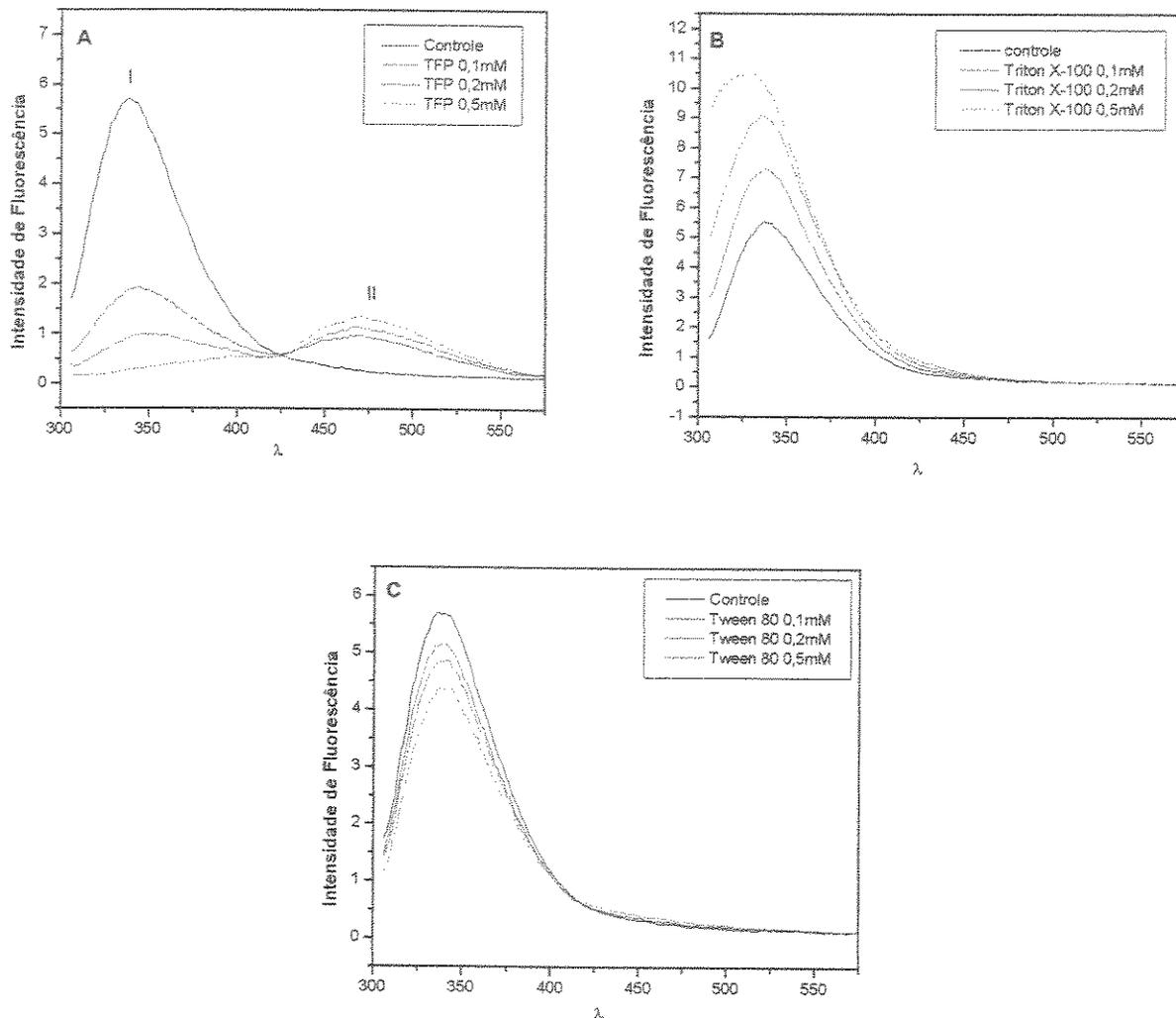


Fig. 30 – Efeito de xenobióticos no espectro de fluorescência do Triptofano. Os espectros de fluorescência foram determinados em suspensão microsomal (1,5mg/ml) tratada com diferentes concentrações de xenobióticos, TFP (A), onde (I) 330nm e (II) 470nm, Triton X-100 (B) e Tween 80 (C). As amostras foram diluídas em tampão fosfato de potássio pH 7,4 e os experimentos realizados à temperatura de 23°C (Excitação - 295nm). Controle – ausência de xenobiótico.

Embora também seja um detergente não iônico, o Tween 80 não é um bom solubilizador de membranas por causa da sua grande cabeça apolar associada à dupla ligação existente em sua cadeia acila e a disposição da suas caudas de PEG o que diminui os níveis de deslipidação e dificulta sua inserção na

membrana, favorecendo, portanto, sua ligação com a proteína (Attwood & Florence, 1983, de Foresta et al., 1989).

Novamente apenas a concentração de 0,1mM levou a um aumento da atividade do P450 e da NCR, indicando que a doação do primeiro elétron está acontecendo mesmo em concentrações acima da CMC. No entanto, a ausência da atividade do citocromo b5 indica que uma parte do ciclo catalítico não está ocorrendo. A hipótese de que o Tween 80 está interagindo diretamente com a proteína é confirmada pela diminuição da intensidade do pico de Trp, indicando que este resíduo está sendo exposto á fase aquosa da suspensão. O ataque deste xenobiótico à proteína estaria ocorrendo, portanto, através da sua porção hidrofílica, porque este xenobiótico não entra por completo na membrana, assim como a TFP.

A funcionalidade do P450 está intimamente ligada à interação entre os aminoácidos e o ambiente lipídico da membrana. Este último é responsável pela transferência de elétrons da redutase para o P450 através da fosfatidilcolina e qualquer alteração neste meio leva à perda de atividade deste citocromo. A análise da intensidade de fluorescência do Trp reflete as alterações conformacionais sofridas pelo citocromo P450 e pelo ambiente lipídico na presença dos xenobióticos estudados, mostrando claramente que estes são capazes de interagir tanto com a membrana quanto com os resíduos de aminoácido da porção citossólica do P450 (Fent & Stegeman, 1991, Fent & Bucheli, 1994, Yun et al., 1996, Yun et al., 1997).

A “supressão” de fluorescência como observada na presença de Tween 80 e da TFP pode ser causada por vários fatores, entre os quais a formação de complexos e a transferência de energia, ambos gerados pela interação entre o fluoróforo (Trp) e o supressor (xenobiótico). Neste caso, os dois xenobióticos estariam se ligando aos constituintes protéicos da membrana próximo aos resíduos de Trp, provocando a transferência de cargas e alterações

entre as interações de aminoácidos, o que, por consequência, leva a mudanças na conformação da proteína que estaria expondo seus resíduos de Trp a um ambiente mais hidrofílico (Lakowicz, 1983, Ruggieiro & Meirelles, 1998).

Segundo Black (1992), os resíduos de Trp estão localizados na porção citoplasmática (polar) do P450, o que facilita o acesso do xenobiótico à proteína. Nesta porção hidrofílica da proteína também se encontra o grupamento heme e, portanto, o sítio ativo do P450. Qualquer alteração nesta região implica na inativação da proteína (Black, 1992, Neunaber & Achazi, 1999). Os resultados obtidos com a análise dos três xenobióticos confirmam a posição deste resíduo na porção citossólica e o fácil acesso do xenobiótico ao centro ativo da proteína, impedindo a interação do P450 com seu substrato.

#### **4.8 – ALTERAÇÕES CAUSADAS PELOS XENOBIÓTICOS NA CARGA DOS COMPONENTES DO SMH.**

A incubação dos microsomas com TFP não causou nenhuma alteração na carga do P450 detectável por eletroforese, como podemos observar na Figura 31, onde todas as bandas ficaram alinhadas com o controle. Neste sentido, é possível inferir que a ação da TFP sobre os microsomas não leva a uma alteração na carga total da proteína, não sendo esta, portanto, a principal responsável pela diminuição do conteúdo do P450.

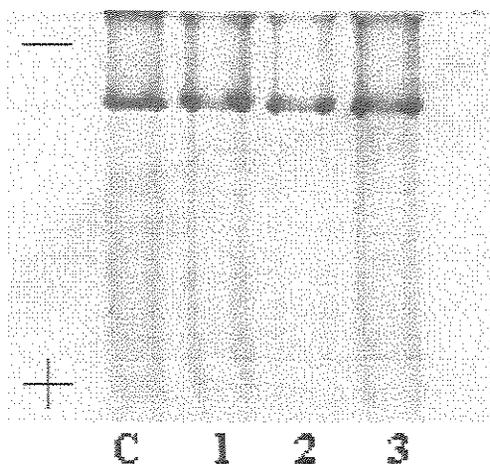


Fig. 31 – Efeito da TFP na carga total da suspensão microssomal. Gel nativo da suspensão microssomal (9,98mg/ml) de *P. scrofa*, incubada com diferentes concentrações de TFP. (C) – Controle (ausência de xenobióticos); (1) – 0,1mM; (2) – 0,2mM; (3) 0,5mM.

O Triton X-100 causou alterações na carga total da proteína, deixando-a mais negativa em relação ao controle, pois as bandas tratadas migraram para o anodo da placa com mais facilidade (Fig.32). O P450 estaria sofrendo, portanto, uma desprotonação, pois sua carga total tornou-se mais negativa, indicando uma mudança no meio. Este resultado sugere que a inibição da atividade nos componentes do SMH é dada pela ligação, provavelmente competitiva, do Triton X-100 no sítio catalítico dos componentes do SMH. Contudo, nem todas as proteínas do sistema parecem estar sofrendo esta desprotonação, já que é possível observar suaves impressões no gel, indicando que algumas proteínas do SMH não ficaram negativas.

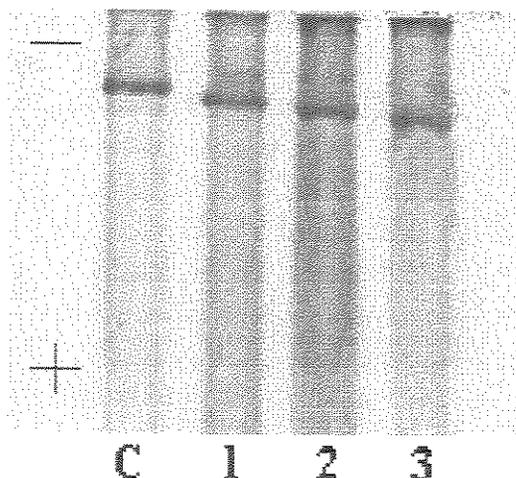


Fig. 32 – Efeito do Triton X-100 na carga total da suspensão microssomal. Gel nativo da suspensão microssomal (9,98mg/ml) de *P. scrofa*, incubada com diferentes concentrações de Triton X-100. (C) – Controle (ausência de xenobiótico); (1) – 0,1mM; (2) – 0,2mM ; (3) 0,5mM.

Na presença do Tween 80 detectamos uma suave alteração da carga da proteína, agora mais positiva que o controle, já que as bandas tratadas estão mais perto do cátodo da placa (Fig. 33). Neste experimento todas as proteínas do SMH sofreram o mesmo tipo de alterações na carga total: uma protonação que as deixou um pouco mais básicas.

Em condições nativas, o princípio da eletroforese seria que as proteínas corresse contra um gradiente de pH e estacionem quando alcançarem sua forma neutra, ou seja, próxima do seu ponto isoelétrico (pI). A principal hipótese para a ocorrência desta mudança de carga seria que a interação dos xenobióticos com os aminoácidos da porção hidrofílica do P450 levaria à alteração na carga total da proteína e a conseqüente mudança do seu ponto isoelétrico. Sabendo-se que o pI é um balanço entre a carga dos aminoácidos ácidos e básicos, pode-se dizer que enquanto o Triton X-100 levou ao aumento da carga negativa das proteínas que compõem o SMH, o Tween 80 causou um aumento da carga positiva da proteína

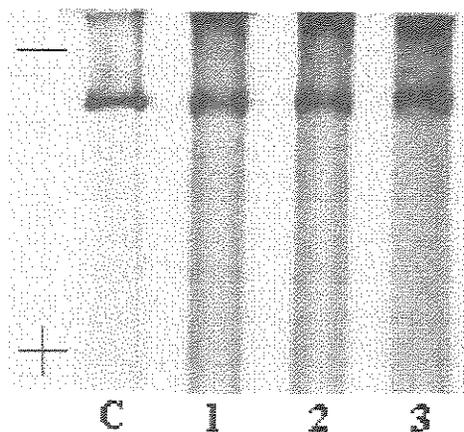


Fig. 33 – Efeito do Tween 80 na carga total da suspensão microssomal. Gel nativo da suspensão microssomal (9,98mg/ml) de *P. scrofa*, incubada com diferentes concentrações de Tween 80. (C) – Controle; (1) – 0,1mM ; (2) – 0,2mM ; (3) 0,5mM.

As alterações detectadas pela eletroforese em condições nativas correspondem às alterações na carga final da proteína, não identificando, contudo, exatamente onde ela ocorreu. É provável que estas alterações ocorram principalmente na porção voltada para o exterior da vesícula microssomal, facilitando o ataque dos xenobióticos. No entanto, como o trabalho dedica-se à análise de xenobióticos com características anfífilas, torna-se pertinente não excluir a hipótese de que estes também possam estar causando danos na porção hidrofóbica da proteína, isto é, aquela embebida na membrana.

## 5 - CONCLUSÕES

A escolha do sistema P450 e das enzimas antioxidantes existentes em *Prochilodus scrofa* como possíveis biomarcadores de poluição ambiental nos permitiu as seguintes conclusões:

- 1) A caracterização espectral do citocromo P450 mostrou a existência de um pico em 420 nm que poderia ser anômalo ao sistema e representar uma hemoproteína ainda não descrita.
- 2) A purificação parcial do citocromo P450 por HPLC se mostrou eficiente na detecção de um pico, que por eletroforese confirmou a presença de apenas uma banda com massa molecular de 54.000Da referente, segundo a literatura, ao P450.
- 3) A análise da enzima NADPH citocromo P450 redutase mostrou que apenas a Trifluoperazine é capaz de aumentar sua atividade, o que está de acordo com dados da literatura para outros fenotiazínicos derivados. Contrariamente, o Triton X-100 e o Tween 80 levaram à inibição da atividade desta enzima, o que também está de acordo com a literatura quando se usa surfactantes em concentrações acima da CMC.
- 4) A presença dos xenobióticos no sistema mostra que estes são capazes de interagir com a membrana provocando uma mudança conformacional da proteína, detectada através das alterações na intensidade de fluorescência do Triptofano e na carga dos componentes do sistema detectada via eletroforese em condições nativas. Enquanto o Triton X-100 faz com que o Trp seja exposto a um ambiente mais hidrofóbico, o Tween 80 e a TFP expõem tais resíduos a um ambiente mais hidrofílico.

- 5) Compostos com características surfactantes podem causar a inativação dos componentes do sistema microsomal hepático tanto na forma de monômeros como na forma de micelas.
- 6) A TFP foi o único xenobiótico a ser metabolizado pelo sistema P450. Isto foi constatado através da ativação da isoforma CYP1A e das enzimas NADPH citocromo P450 redutase e Glutathione – S – Transferase. No entanto fica evidente que o NADPH provoca a inativação, dependente do tempo, do sistema P450.
- 7) A metabolização da TFP gera metabólitos capazes de interagir com o citocromo P450 levando à sua inativação e alterações na conformação da proteína. A inativação do P450 pela Trifluoperazine é seletiva uma vez que foi possível detectar a ativação da CYP1A.
- 8) As atividades das enzimas antioxidantes em *Prochilodus scrofa* são semelhantes às aquelas encontrados na literatura para outros teleósteos de água doce, onde a da Catalase é superior a da Superóxido Dismutase devido à acidez do meio, responsável pelo aumento nas taxas de formação de peróxido de hidrogênio.
- 9) Os ensaios “*in vitro*” para analisar os efeitos dos xenobióticos Triton X-100 e Tween 80 sobre as enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica mostraram-se semelhantes aos encontrados na literatura. Enquanto o Triton X-100 age diretamente na membrana provocando alterações no ambiente lipídico que podem acarretar em mudanças na atividade da enzima, o Tween 80 é capaz de interagir diretamente com as enzimas antioxidantes causando alterações na atividade das mesmas.

- 10) Os ensaios “*in vitro*” com a TFP mostraram que esta tem efeito protetor contra os danos oxidativos sofridos pela membrana, o que está de acordo com os dados da literatura.
- 11) A atividade da enzima Glutathione – S – Transferase aumentou na presença dos três xenobióticos no sistema, sendo que na presença da TFP esta indução foi maior do que a verificada com os outros dois xenobióticos, indicando que esta enzima, ao contrário do sistema P450, é capaz de metabolizar tais compostos, devido ao fato desta ser uma enzima citossólica e, portanto, independente do ambiente de membrana para atuar, como observado para os componentes do sistema microsomal hepático.
- 12) Foi detectada a ativação da isoforma CYP1A no fígado de *Prochilodus scrofa* confirmando que realmente esta é a isoforma mais abundante em peixes como relatado na literatura.
- 13) O conjunto de dados apresentado até o momento sugere que o citocromo P450 em *Prochilodus scrofa* é uma potente ferramenta de biomarcação desde que seja usado em conjunto com outras enzimas do sistema, como a EROD, a NCR, as antioxidantes etc., uma vez que os xenobióticos interagem de maneira diferente com cada um dos componentes do sistema microsomal hepático.

---

## **6 – BIBLIOGRAFIA**

Achazi, R. K.; Flenner, C., Livingstone, D.R., Peters, L.D., Schaub, K., Scheiwe, E., 1998. Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids. **Comp. Biochem. Physiol.** 121C: 339-350.

Adams, S. M. , 1990. Status and use of biological indicators for evaluation the effects of stress on fish. In **Biological indicators of stress in fish**. Edited by S. Marshall Adams. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland. pp 1-8.

Aebi, H., 1884. Catalase *in vitro*. **Meth Enzymol.** 105: 121-127.

Aksnes, A. & Njaa, L. R., 1981. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. **Comp. Biochem. Physiol.** 69B: 893-896.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D., 1994. **Molecular Biology of the Cell**. 3<sup>rd</sup>ed. Garland Publishing, Inc. New York & London.

Alvarez, J., Montero, M. & Garcia-Sancho, J., 1992. Cytochrome P450 may regulate the plasma membrane Ca<sup>+2</sup> permeability according to the filling state of the intracellular Ca<sup>+2</sup> store. **FASEB J.** 6: 786-792.

Arun, S., Krishnamoorthy, P. & Subramanian, P., 1999. Properties of glutathione peroxidase from hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. **Intern. J. Biochem. Cell Biol.** 31: 725-732.

Attwood, D. & Florence, A. T. , 1983. **Surfactants systems – Their chemistry, pharmacy and biology**. Chapman & Hall Publisher. London, New York.

Au, D. W. T., Wu, R.S.S., Zhou, B. S., Lam, P.K. S., 1999. Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to Benzo[a]pyrene. **Environ. Pollut.** 104: 235-247.

Avakumov, V., Müller, D., Glockner, R. & Klinger, W.; 1978. The influence of chloracizine (Ch) and floracizine (Ft) on hexobarbital sleeping time, ethylmorphine N-demethylation and cytochrome P450 and b5 concentration in rat liver. **Biochem. Pharmacol.** 27:2177-2179.

Bainy, A.C. D., 1996. Oxidative stress as a biomarker of polluted aquatic site. In: **Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon**. Edited by A. L. Val, V. M. F. Almeida-Val & D. J. Randal. Manaus, Brasil.

Banghan, J. A. & Lea, E. J. A., 1978. The interaction of detergent with the bilayer membranes. **Biochim. Biophys. Acta.** 511: 388- 396.

Barthelemy, L., Belaud, A. & Chastel, 1981. A comparative study of oxygen toxicity in vertebrates. **Resp. Physiol.** 44: 261-268.

Bayol-Denizot, C., Daval, J.L., Netter, P. & Minn, A., 2000. Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rats cerebral endothelial cell, astrocytes, and neurones. **Biochim. Biophys. Acta** 1497:115-126.

Beales, D. & McLean, A.E.M., 1996. Protection in the late stages of paracetamol-induced liver cell injury with fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. **Toxicology** 107: 201-208.

Beers, R. F. & Sizer, I. W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J. Biol. Chem.** 195:133-140.

Bergmeyer, H.U., 1965. **Methods of Enzymatic Analysis**. 2<sup>o</sup>eds. Academic Press.

Bernhardt, R., 1995. Cytochrome P450: structure, function and generation of reactive oxygen species. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 127:138-221.

Berthod, A., Tomer, S. & Dorsey, J.G., 2001. Polyoxyethylene alkyl ether nonionic surfactants: physicochemical properties and use for cholesterol determination in food. **Talanta** 55:69-83.

Beyer, J. & Gokøyr, A., 1993. Cytochrome P450 observation in gulf fish. **Mar. Pollut. Bull.** 27: 292-296.

Black, S. D., 1992. Membrane topology of mammalian P450 cytochromes. **FASEB J.** 6: 680-685.

Boveris, A. & Bermudez, M. J. N., 1996. Production of superoxide anion and hydrogen peroxide in vertebrates tissue, in **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Edited by A. L. Val; V. M. F. Almeida-Val & D. J. Randal. pp 299-312.

Boveris, A., Fraga, C.G., Varsavsky, A.I. & Koch, O.R., 1983. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch. Biochem. Biophys.** 227(2): 534-541.

Breyer, U., 1971. Metabolism of phenothiazine drug perazine by liver and lung microsomes from various species. **Biochem. Pharmacol.** 20: 3341-3351.

Buege, J.A. & Aust, S.D., 1984. Microsomal lipid peroxidation. **Meth Enzymol.** 52:30-37.

Buhler, D. R. & Wang-Buhler, J. L., 1998. Rainbow trout cytochrome P450: purification, molecular aspects, metabolic activities, induction and role in environmental monitoring. **Comp. Biochem. Physiol.** 121C:107-137.

Buhler, D. R. & Rasmusson, M. E., 1968. The oxidation of drugs by fishes. **Comp. Biochem. Physiol.** 25:223-239.

Buzukov, A. A., Il'asova, V.B., Tabak, M., Meirelles, N.C. & Degterev, I.A., 1996. An ESR and spectrophotometric study of the dinitration of nitroheterocyclic drugs by liver homogenates and their metabolic consumption by liver microsomes from cytochrome P450-induced mice. **Chem. Biol. Interac.** 100:113-124.

Cadenas, E., 1981. Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann. Rev. Biochem.** 58:79-110.

Calow, P. & Forbes, V. E., 1998. How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary process? **Comp. Biochem. Physiol.** 120A:11-16.

Carafa, M., Lucania, G., Dolo, V., Giammatteo, M., Torrisci, M. R., Satucci, E. & Pavan, E. 1999., Morphological analysis of the interaction of charged surfactants vesicles (SVs) with humam cultured cell. **Biotech Histochem.** 74: 77-84.

Chiang, J. Y. L., 1981. Interaction of Purified Microsomal Cytochrome P450 with cytochrome b5. **Arch. Biochem. Biophys.** 211: 662-673.

Connor, K., Safe, S., Jefcoat, C.R. & Larsen, M., 1995. Structure-dependent induction of CYP2B by polychlorinated biphenyl congeners in female Sprague-Dawley rats. **Biochem. Pharmacol.** 50: 1913-1920.

Coon, M. J., Ding, X., Perneckey, S. J. & Vaz, A. D. N., 1992. Cytochrome P450: progress and prediction. **FASEB J.** 6:669-673.

Cooper, W. J. & Zika, R. G., 1983. Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. **Science** 220: 711-712.

Cousinou, M., Nilsen, B., Lopez-Barea, J. & Dorado, G., 2000. New methods to use cytochrome P4501A1 to assess marine organic pollutants. **Sci. Total Environ.** 247:231-225.

Cummings, B. S., Parkert, J. C. & Lash, L. H., 2000. Role of cytochrome P450 and Glutathione – S – Transferase  $\alpha$  in the metabolism and cytotoxicity of Trichloroethylene in rat kidney. **Biochem. Pharmacol.** 59:531-543.

de Foresta, B., le Maire, M., Orlowski, S., Champeil, P., Lund, S., Møller, J.V., Michelangeli, F. & Lee, A. G., 1989. Membrane solubilization by detergent: use of

brominated phospholipids to evaluate the detergent-induced changes in  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase/lipid interaction. **Biochemistry** 28: 2558-2567.

de Montellano, P. R. O. & Correia, M. A., 1983. Suicidal destruction of cytochrome P450 during oxidative drug metabolism. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 23:481-503.

de Moraes, L. A. F., Lenzi, E. & Luchese, E. B., 1997. Mercury in two fish species from the Paraná River floodplain, Paraná, Brazil. **Environ. Pollut.** 98:123-127.

De Pierre, J. W. & Ernster, L., 1977. Enzyme topology of intracellular membranes. **Ann. Rev. Biochem.** 46: 201-262.

De Pierre, J. W. & Dallner, G., 1975. Structural aspects of the membrane of endoplasmic reticulum. **Biochim. Biophys. Acta** 415: 411-472.

Degterev, I.A.; Meirelles, N.C.; Vercesi, A. E. & da Silva, M.E.F., 1999. Redox properties of hepatic cytochromes from Prochilodus scrofa (Curimatá), a freshwater fish. In: **Biology of tropical fishes**. Edited by A. L. Val e V. M. F. Almeida-Val. INPA, Manaus, AM. Brasil. pp 253-261.

den Besten, P. J., 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. **Mar Environ. Res.** 46: 253-256.

Dwivedi, P.D., Das, M. & Khanna, S.K., 1998. Role of cytochrome P450 in quinalphos toxicity: effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats. **Food Chem. Toxicol.** 36:437-444.

Eggens M.; Bergman, A. & Vethaak, D., 1995. Seasonal variations of hepatic EROD activity in flounder (Platichthys flesus) in the Dutch Wadden Sea. **Mar. Environ. Res.** 39:231-234.

Eggens, M. L.; Opperhuizen, A. & Boon, J. P., 1996. Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, Platichthys flesus, from the Dutch Wadden Sea. **Chemosphere.** 33: 1579-1596.

Estabrook, K. R. W., 1978. Microsomal electron transport reaction: an overview. **Meth. Enzymol.** 52:43-47.

Farombi, E. O., 2000. Influence of amodiaquine treatment on microsomal lipid peroxidation and antioxidant defense systems of rats. **Pharmacol. Toxicol.** 87: 249-254.

Fent, K & Bucheli, T. D. ; 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organitins in vitro freshwater fish. **Aquatic. Toxicol.** 28:107-126.

Fent, K. & Stegeman, J. J.; 1991. Effects of Tributyltin chloride in vitro on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish Stenotomus chrysops. **Aquatic Toxicol.** 20:159-168.

Fent, K., Woodin, B. R. & Stegeman, J. J., 1998. Effects of triphenyltin and others organitins on hepatic monooxygenase system in fish. **Comp. Biochem Physiol.** 121C:277-288.

Fernandes, M. N., Barrionuevo, W. R. & Rantin, F. T., 1995. Effects of the termal stress on respiratory reponses to hipoxia of a South American Prochilodontid fish, Prochilodus scrofa. **J. Fish. Biol.** 46:123-133.

Fitzgerald, J. P., 1992. Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 101B: 111-114.

Flohé, L. & Günzler, W. A., 1984. Assay of Glutathione Peroxidase. **Meth. Enzymol.** 105:113-121.

Flohé, L. & Ötting, F., 1984. Superoxide Dismutase assay. **Meth. Enzymol.** 105: 93-104.

Fraga, C.G., Cavanagh, E., Carrasquedo, F., Lotito, S., Lucesoli, F. & Oteiza, P. I., 1996. Antioxidant defenses and mechanism of protection against oxygen radicals, in **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Edited by A. L. Val; V. M. F. Almeida-Val & D. J. Randal. pp 299-312.

Fridovich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. **Science** 201: 875-880.

Galembeck, E., Alonso, A. & Meirelles, N. C., 1998. Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene 9n]non-ionic surfactants. **Chem. Biol. Interact.** 113:91-103.

Garda, H. A. & Brenner, R. R., 1984. Short-chain aliphatic alcohols increase rat-liver microsomal membrane fluidity and affect the activities of some microsomal membrane bound enzymes. **Biochim. Biophys. Acta** 769:160-170.

Gilewicz, M.; Guillaume, J. R.; Carles, D.; Leveau, M. & Bertrand, J. C., 1984. Effects of petroleum hydrocarbons on the cytochrome P450 content of mollusc bivalve Mytilus galloprovincialis. **Mar. Biol.** 80:155-159.

Godoy, M. P., 1975. **Peixes do Brasil – Subordem Chariciforme**. 1ª ed. Editora Franciscana. Piracicaba, S.P.

Gokøyr, A. & Husøy, A. M., 1998. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. In, **Fish Ecotoxicology**. Ed. By T. Braunbeck; D. E. Hinton & B. Street. pp 165-202.

Goldfarb, P.; Livingstone, D. & Burmelin, C., 1998. Biomonitoring in the aquatic environment: use of molecular biomarkers. **Biochem. Soc. Transac.** 26:690-694.

Gracy, R.W., Talent, J.M., Kong, Y., Conrad, C.C., 1999. Reactive oxygen species: The unavoidable environmental insult?. **Mut. Res.** 428:17-22.

Graham, S. E. & Peterson, J. A., 1999. How similar are P450s and what their differences teach us. **Arch Biochem. Biophys.** 369: 24-29.

Graham-Lorence, S & Peterson, J. A., 1996. P450s: Structural similarities and functional differences. **FASEB J.** 10:206-214.

Guengerich, F. P. , Bell, L. C., Okazaki, O., 1995. Interpretation of cytochrome P450 mechanisms from kinetics studies. **Biochimie** 77:573-580.

Guengerich, F. P., 1997. Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. **Adv. Pharmacol.** 43: 7- 35.

Guengerich, F.P., 1977. Separation and Purification of multiples forms of microsomal cytochrome P450. **J. Biol. Chem.** 252: 3970-3570.

Guengerich, F.P., Hosea, N. A., Parikh, A., Bell-Parikh, C., Johnson, W. W., Gillam, E. M. J. & Shimada, T., 1998. Twenty years of biochemistry of human P450. Purification, expression, mechanism and relevance to drug. **Drug Met. Disp.** 26: 1175-1178.

Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B., 1974. Glutathione – S – Transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** 249: 7130-7139.

Halkier, B. A., 1996. Catalytic reactivities and structure/ function relationship of cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry** 43: 1-21.

Halpert, J. R.; 1995. Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 35:29-53.

Haugen, D. A., van der Hoeven, T. A. & Coon, M. J., 1975. Purified liver microsomal cytochrome P450. **J. Biol. Chem.** 250: 3567-3570.

Heffernan, L. M. & Winston, G. W., 1998. Spectral analysis and catalytic activities of the microsomal mixed –function oxidase system of the sea anemone (phylum: Cnidaria). **Comp. Biochem. Physiol.** 121C:371—383.

Hermes-Lima, M., Storey, J.M. & Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snail. **Comp. Biochem. Physiol.** 120B: 437-448.

Hird, H. J., McLean, E. J. T. & Munro, H. N., 1964. Incorporation of amino acids by the protein of the post-microsomal fraction of rat liver. **Biochim. Biophys. Acta** 87: 219-231.

Hosea, N. A. & Guengerich, F. P., 1998. Oxidation of nonionic detergents by cytochrome P450 enzymes. **Arch. Biochem. Biophys.** 353: 365-373.

Hu, X., Seidel, A, Frank, H., Srivastava, S. K., Xia, H., Pal, A, Zheng, S., Oesch, F. & Singh, S. V., 1998. Differential enantioselectivity of murine Glutathione – S – Transferase isoenzymes in the glutathione conjugation of *Trans*-3,4 dihydroxy-1,2-oxy-1,2,3,4 – tetrahydrobenzo[c]phenanthrene stereoisomers. **Arch. Biochem. Biophys.** 358:40-48.

Imaoka, S., Imai, Y., Shimada, T. & Funae, Y., 1992. Role of phospholipids in reconstituted cytochrome P4503A: form and mechanism of their activation of catalytic activity. **Biochemistry** 31: 6063-6069.

Inouye, K., Kondo, S., Yamamura, M, Nakanishi, D. & Sakaki, T., 2001. Inhibitory effects of detergents rat CYP1A1- dependent monooxygenase: comparison of mixed and fused system consisting of rats CYP1A1 and yeast NADPH – P450 reductase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 280:1346-1351.

Isomaa, B. & Lilius, H., 1995. The urgent need for *in vitro* tests in ecotoxicology. **Toxic. In Vitro** 9:821-825.

Iyer, K. R. & Sinz, M. W., 1999. Characterization of phase I and phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparation. **Chem. Biol. Interac.** 118:151-169.

James, M.O., 1989. Cytochrome P450 monooxygenases in crustaceans. **Xenobiotica** 19: 1063-1076.

Jansson, I & Schenkman, J. B., 1996. Substrate influence on interaction between cytochrome P450 and cytochrome b5 in microsomes. **Arch. Biochem. Biophys.** 325: 265-269.

Jansson, I., Curti, M., Epstein, P. M., Peterson, J. A. & Schenkman, J. B., 1990. Relationship between phosphorylation and cytochrome P450 destruction. **Arch. Biochem. Biophys.** 283: 285-292.

Jene, Q., Pearson, J.C. & Lowe, C.R., 1997. Surfactant modified enzymes: solubility and activity of surfactant modified catalase in organic solvents. **Enzyme Microbiol. Technol.** 20:69-74.

Jewett, S.L., Rocklin, A.M., Ghanevati, M., Abel, J.M. & Marach, J.A., 1999. A new look at time-worn system: oxidation of CuZn-SOD by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Free Rad. Biol. Med.** 26:905-918.

Jimenez, B. D. & Stegeman, J. J., 1990. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress in fish. In **Biological indicators of stress in fish**. Edited by S. Marshall Adams. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland. pp 67-79.

Jones, M.N. , 1999. Surfactants in membrane solubilization. **Int. J. Pharm.** 177:137-159.

Junqueira, V.B., Koch, O.R., Arisi, A.C.M., Fuzaro, A.P., Azzalis, L.A., Barros, S.B.M., Cravero, A., Farré, S. & Videla, L.A., 1997., Regression of morfological alteration and oxidative stress-related parameters after acute lindane-induced hepatotoxicity in rats. **Toxicology** 117:199-205.

Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. & Hatakka, A., 1999. Coupling of manganese peroxidase – mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and <sup>14</sup>C-labeled lignins. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**259:212-219.

Klotz, A.V., Stegeman, J. J. & Walsh, C., 1983. An aryl hydrocarbon hydroxylating cytochrome P450 from the marine fish *Stenotomus chrysops*. **Arch. Biochem. Biophys.** 226:578-592.

Koblyakov, V. A., 1998. Inducers of the cytochrome P450 superfamily as promoters of carcinogenesis. **Biochemistry** 63: 885-898.

Kolm, R. H., Danielson, H., Zhang, Y., Talalay, P. & Mannervik, B., 1995. Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. **Biochem. J.** 311: 453-459.

Kono, Y. & Fridovich, I., 1982. Superoxide radicals inhibits catalase. **J. Biol. Chem.** 257: 5751-5754.

Krishnakumar, P. K., Casilas, E. & Varanasi, U. , 1995. Effects of chemical contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington. II. Cytochemical detection of subcellular changes in digestive cells. **Mar. Biol.** 125:251-259.

Labella, F. S., 1991. Cytochrome P450 enzymes: ubiquitous “receptors” for drugs. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 69:1129-1132.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the

head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

Lakowicz, J. R., 1983. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Plenum Press. New York, London. 496p.

Lange, U., Jedamski-Grymlas, J., Siebers, D. & Karbe, L., 1992. Ethoxyresorufin O-deethylase and cytochrome P450 in the liver of Dab (*Limanda limanda* (L)) from the central and southern north sea. **Mar. Poll. Bull** 24: 446-451.

Le Maire, M. , Champeil, P. & Møller, J. V., 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilization detergents. **Biochim. Biophys. Acta** 1508:86-111.

Le, H. T. & Franklin, M. R., 1997. Selective induction of phase II drug metabolizing enzymes activities by quinolines and isoquinolines. **Chem. Biol. Interac.** 103: 167-178.

Leitão, M.E.S.; Affonso, E. G.; da Silva, M. E. F.; Meirelles, N.C.; Rantin, F.T.; Vercesi, A. E.; Junqueira, V.B.C. & Degtarev, I. A., 2000. The liver monooxygenase system of Brazilian freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 121C:29-38.

Levin, W., Lu, A. Y. H., Jacobson, M. & Kuntzman, R., 1973. Lipid peroxidation and degradation of cytochrome P450 heme. **Arch. Biochem. Biophys.** 158:842-852.

Livingstone, D. R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystem: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 120A:43-49.

Livingstone, D. R.; Kuchen, M. A. & Wiseman, A., 1989. Cytochrome P450 and oxidative metabolism in molluscs. **Xenobiotica** 19: 1041-1062.

Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L., Bucke, D. & Law, R.J., 1993. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin – O-deethylase activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and others chemicals. **Mar. Poll. Bull.** 26:602-606.

Lochmiller, R. L.; McMurry, S. T., McBee, K.; Rafferty, D. P.; Lish, J. W.; Qualls Jr, C. W., 1999. Seasonal hepatic cytochrome P450 induction in cotton rats (*Sigmodon hispidus*) inhabiting petrochemical waste site. **Environ. Pollut.** 105:191-196.

Longo, V., Amato, G., Salvetti, A., Gervasi, P.G., 2000. Heterogenous effects of anthraquinones on drug-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of rat. **Chem. Biol. Interact.** 126:63-77.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J. Farr, A. L. & Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

---

Lück, H., 1965. Catalase. In **Methods of Enzymatic Analysis**. 2<sup>o</sup>eds. Academic Press.

Machala, M., Neca, J., Drábeck, P., Ulrich, R., Sabatová, V., Nezveda, K., Raszyk, J., Gajduskova, V., 1998. Effects of chronic exposure to PCBs on cytochrome P450 system and steroidogenesis in liver and testis of bulls (*Bos taurus*). **Comp. Biochem. Physiol.** 120A:65-70.

Malheiros, S. V. P.; Meirelles, N. C. & de Paula, E., 1998. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochim. Biophys. Acta** 1373:332-340.

Malheiros, S. V. P.; Meirelles, N. C. & de Paula, E.; 2000. Pathways involved in Trifluoperazine dibucaine and praziquantel-induced hemolysis. **Bioph. Chem.** 83:89-100.

Mansuy, D., 1998. The great diversity of reaction catalysed by cytochrome P450. **Comp. Biochem. Physiol.** 121C: 5-14.

Mansuy, D., Beaune, P. Chottard, J. C., Bartoli, J. F. & Gans, P., 1976. The nature of the "455 nm absorbing complex" formed during the cytochrome P450 dependent oxidative metabolism of amphetamine. **Biochem. Pharmacol.** 25: 609-612.

Marcon, J. L., 1996. Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomun*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa. **Tese de doutorado**. INPA/UFAM, Manaus, AM, Brasil.

Marcon, J.L. & Wilhelm-Filho, D., 1999. Antioxidant process of wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. **Comp. Biochem. Physiol.** 123C: 257-263.

Marczylo, T. & Ioannides, C., 1999. Evidence for the presence of a microsomal NADH-dependent enzyme system that can bioactivate aromatic amines in the liver of rats and mice. **Toxicology** 134:127-141.

Marrowm, P. J. & Curry, J., 1993. Red blood cell partitioning protein binding and lipophilicity of six phenothiazine. **J. Pharm. Pharmacol** 45:39-42.

Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidants enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology** 153: 83-104.

Matsubara, T., Koike, M., Touchi, A., Tochino, Y. & Sugeno, 1976. Quantitative determination of cytochrome P450 in rat liver microsomes. **Anal. Biochem.** 75: 596-603.

Misra, H. P. & Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.** 247: 3170-3175.

Mitchelmore, C. L., Chipman, J. L., Garcia-Martinez, P., Lemaire, P., Peters, L. D. & Livingstone, D.R., 1996. Normal status of hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in Turbot (*Scophthalmus maximus*) and other flatfish species following exposure to nitroaromatic compounds. **Mar. Environ. Res.** 42:329-333.

Murray, M. & Reidy, G. F., 1989. *In vitro* inhibition of hepatic drug oxidation by thioridazine. Kinetic analysis of the inhibition of cytochrome P450 isoform-specific reaction. **Biochem. Pharmacol.** 38:4359-4365.

Murray, M., 1992. Inhibition and induction of cytochrome P450 2B1 in rat liver by promazine and chlorpromazine. **Biochem Pharmacol.** 44:1219-1222.

Nakhgevany, R., Bonsu, O., Barber, J., Mabrouk, P. A., Ueng, Y. F., Bell, L. C. & Guengerich, P.F. P., 1996. Preparation, purification and spectrophotometric characterization of cytochrome P4501A2 conjugated with polyethyleneglycol monomethyl ether. **Biochem. Biophys. Res Comm.** 222:406-409.

Nebert, D. W. & Gonzalez, F. J. , 1987. P450 genes, structure, evolution and regulation. **Ann. Rev. Biochem.** 56:945-993.

Nebert, D. W., Nelson, D. R. & Feyereisen, R., 1989. Evolution of the cytochrome P45 genes. **Xenobiotica** 19: 1149-1160.

Neunaber, R. & Achazi, R.K., 1999. A novel endogenous inhibitor of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity isolated from liver cytosolic fraction of bream (*Abramis brama* L.). **Comp. Biochem. Physiol.** 124B:89-100.

Oetari, S, Sudiby, M., Commandeur, J. N. M., Samhoedi, R., Vermeulen, N. P. E., 1996. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione – S- Transferase activities in rat liver. **Biochem. Pharmacol.** 51:3-45.

Ohkawa, H. , Ohishi, N. & Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95: 351-358.

Ohyshiki, T., Suzuki, S., Satoh, E. & Uemori, Y., 1998. A marked stimulation of Fe<sup>2+</sup>-initiated lipid peroxidation in phospholipid liposomes by lipophilic aluminum complex, aluminum acetylacetonate. **Biochim. Biophys. Acta** 1389:141-149.

Olson, K.R., 1998. Hormone metabolism by fish gill. **Comp. Biochem. Physiol.** 119A: 55-65.

Omura, T. & Sato, R. , 1964a. The Carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. I - Evidence for its heme protein nature. **J. Biol. Chem.** 239:2370-2378.

Omura, T. & Sato, R.; 1964b. The carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. II – Solubilization, purification and properties. **J. Biol. Chem.** 239: 2379-2385.

Omura, T. , 1999. Forty years of cytochrome P450. **Biochem. Biophys Res. Comm.** 266:690-698.

Oruç, E. Ö & Üner, 1999. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolism in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. **Environ. Pollut.** 105:26-272.

Otani, K. & Aoshima, T., 2000. Pharmacogenetics of classical and new antipsychotic drugs. **Therap. Drug Monit.** 22:118-121.

Oteiza, P.I., Fraga, C.G. & Keen, C.L., 1993. Aluminum has both oxidant and antioxidant effects in mouse brain membranes. **Arch. Biochem. Biophys.** 300:517-521.

Paolini, M., Biagi, G. L. & Cantelli-Forti, G., 1999. The many consequences of chemical and genetic-based modulation of drug metabolism enzyme activity. **Life Sci.** 65:75-79.

Parihar, M. S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K. & Prakash, P., 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. **J. Therm. Biol.**22: 151-156.

Partearroyo, M. A., Ostolaza, H., Goni, F. M. & Barberá-Guillem, E., 1990. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B16 melanoma cells. **Biochem. Pharmacol.** 40: 1323-1328.

Pauls, E. & Bertollo, L. A. C., 1990. Distribution of supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica** 81:117-123.

Pedrajas, J. R., Gavilanes, F., López-Barea, J. & Peinado, J., 1998. Incubation of superoxide dismutase and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. Na evaluation of xenobiotics in fish. **Chem. Biol. Interact.** 116:1-17.

Pereira, R. S. & Vercesi, A., 1992. Protective effect of TFP on the mitochondrial induced by  $Ca^{+2}$  plus prooxidants. **Biochem. Pharmacol** 1795:1801.

Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S. & Barja, G., 1993. A comparative study of free radicals in vertebrates – I. Antioxidant Enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.** 105B: 749-755.

Pesonen, M., Korkalainen, M., Laitinen, J. T., Andersson, T. B. & Vakkuri, O., 2000. 2, 3, 7, 8 – Tetrachlorodibenzo-*p* – dioxin alters melatonin metabolism in fish hepatocytes. **Chem. Biol. Interac.** 126:227-240.

Peterson, J. A. & Prough, R. A.; 1986. Cytochrome P450 reductase and Cytochrome b5 in Cytochrome P450 catalysis. In: **Cytochrome P450, structure, mechanism and biochemistry**. Edited by Paul R. Ortiz de Montillano. New York and London – Plenum Press. pp 86-109.

Pohl, R. J. & Fouts, J. R., 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fraction. **Anal. Biochem.** 107: 150-155.

Preté, P.S.C., 2000. Solubilização de membranas de eritrócitos por surfactantes da série Tween. **Tese de mestrado**, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas.

Prough, R. A.; Burke, M. D. & Mayer, B. T., 1978. Direct fluorimetric methods for measuring mixed-function oxidase activity. **Meth. Enzymol.** 52: 374-377.

Puntarulo, S. & Cederbaum, A.I., 1996. Role of cytochrome P450 in stimulation of microsomal production of reactive oxygen species by ferritin. **Biochim. Biophys. Acta** 1289: 238-246.

Puntarulo, S. & Cederbaum, A.I., 1998. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. **Free Rad. Biol. Med.** 24: 1324-1330.

Qian, S. Y. & Buettner, G. R., 1999. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. **Free Rad. Biol. Med.** 26: 1447-1456.

Quabius, E. S., Nolan, D. T., Balm, P. H. M. & Bonga, S. E. W., 1998. The influence of polychlorinated biphenyl 126 on tilapia (*Oreochromis mossambicus*) liver. **Comp. Biochem. Physiol.** 120A:57-63.

Re, J. D., Lee, C. & Riddick, D. S., 1999. Lack of mechanism-based inactivation of rat hepatic microsomal cytochrome P450 by doxorubicin. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 77:589-597.

Riviere, J. L. & Cabanne, F., 1987. Animal and plant cytochrome P450 systems. **Biochimie** 69:743-752.

Robinson, N. C. & Tanford, C., 1975. The binding of Deoxycholate, Triton X-100, Sodium Dodecyl Sulfate and Phosphatidylcoline vesicles to cytochrome b5. **Biochemistry** 14:369-377.

Rodrigues, A. D. & Wong, S. L., 1997. Application of human liver microsomes in metabolism-based drug-drug interaction: *in vitro-in vivo* correlation and the abbott laboratories experience. **Adv. Pharmacol.** 43: 65-101.

Rompelberg, C. J. M., Ploemen, J. H. T. M., Jespersen, S. van der Greef, J., Verhagen, H., van Bladeren, P. J., 1996. Inhibition of rat, mouse, and human glutathione – S – transferase by eugenol and its oxidation product. **Chem. Biol. Interac.** 99:85-97.

Ross, P.H., 1996. Chromatographic separation and behavior of microsomal cytochrome P450 and cytochrome b5. **J. Chromatogr. B** 684:107-131.

Ruggiero, A. C. & Meirelles, N. C.; 1998. Effects of Trifluoperazine on the conformation and dynamics of membrane proteins in human erythrocytes. **Mol. Gen. Metabol.** 64:148-151.

Saint-Denis, M.; Narbonne, J. F.; Arnaud, C.; Thylaud, E. & Ribeira, D., 1999. Biochemical response of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. **Soil Biol. Biochem.** 31:1837-1846.

Sandbacka, M., Christianson, I. & Isomaa, B., 2000. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish – A comparative study. **Toxic. In vitro** 14:61-68

Schreck, C. B., 1990. Physiological, behavior and performance indicators of stress. In **Biological indicators of stress in fish**. Edited by S. Marshall Adams. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland. pp 28-37.

Sekhar, S., Bhat, N. & Bhat, S.G., 1999. Surfactant of detergent permeabilized Bakers' yeast whole cell catalase. **Process Biochem.** 34: 349-354.

Sevrioukova, I. F. & Peterson, J. A., 1995. NADPH P450 reductase: structural and functional comparisons of the eukaryotic and prokaryotic isoforms. **Biochimie** 77:562-572.

Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** 215:213-219.

Soucek, P., Filipcova, B. & Gut, I.; 1994. Cytochrome P450 destruction and radical scavenging by benzene and its metabolites. Evidence for the key role of quinones. **Biochem. Pharmacol.** 47:2233-2242.

Spiteller, G., 1996. Enzymatic lipid peroxidation - a consequence of cell injury. **Free Rad. Biol. Med.** 21:1003-1009.

Stegeman, J. J. & Lech, J. J., 1991. Cytochrome P450 monooxygenase system in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environ Health Perspec.** 90:101-109.

Stegeman, J.J., 1989. Cytochrome P450 form in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. **Xenobiotica**. 19:1093-1110.

Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29: 1715-1733.

Tateishi, T., Kumai, T., Watanabe, M., Tanaka, M. & Kobayashi, S.; 1999. A comparison of the effect of five phenothiazines on hepatic CYP isoenzymes in rats. **Pharmacol. Toxicol.** 85:252-256.

Thomas, P., 1990. Molecular and biochemical responses of fish to stressor and their potential use in environmental monitoring. In **Biological indicators of stress in fish**. Edited by S. Marshall Adams. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland. pp 8-28.

Timbrell, J., 2000. **Principles of Biochemical Toxicology**. 3ª edição. Taylor & Francis. Londres, 394p.

Ueng, Y.F.; Liu, T.Y. & Ueng, T.H., 1995. Induction of cytochrome P4501A1 and monooxygenases activity in tilapia by sediment extract. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 54: 60-67.

Van Bladeren P. J., 1997. Influence of non-nutrient plant components on biotransformation enzymes. **Biomed & Pharmacother.** 51: 324-327.

Vergeres, G., Winterhalter, K. H. & Richter, C., 1989. Microsomal cytochrome P450: substrate binding membrane interactions, and topology. **Mut. Res.** 213: 83-90.

Vrolijk, N.H.; Targett, N. M.; Woodin, B.R. & Stegeman, J.J., 1994. Toxicological and ecological implication of biotransformation enzymes in tropical teleost Chaetodon capistratus. **Mar. Biol.** 119:151-158.

Walker, C. H. & Ronis, M. J.J. , 1989. The monooxygenases of birds, reptiles and amphibians. **Xenobiotica**. 19:1111-1121.

Washburn, B. S., Baden, D. G., Gassman, N. J. & Walsh, P.J., 1994. Brevetoxin: tissue distribution and effect on cytochrome P450 enzymes in fish. **Toxicol** 32:799-805.

Watson, D. E., Reichert, W. & Di Giulio, R. T, 1998. Induction of hepatic CYP1A in channel catfish increases binding of 2-aminoanthracene to DNA *in vitro* and *in vivo*. **Carcinogenesis** 19: 1495-1501.

Welton, A. F. & Aust, S. D.; 1974. The effects of 3-methylcholanthrene and phenobarbital induction on the structure of the rat liver endoplasmic reticulum. **Biophys. Biochem. Acta** 373:197-210.

Wilhelm Filho, D. & Marcon, J. L., 1996. Antioxidant Defense in Fish of the Amazon, in **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Edited by A. L. Val; V. M. F. Almeida-Val & D. J. Randal. pp 299-312.

Wilhelm-Filho, D., 1996. Fish antioxidant defenses – A comparative approach. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29: 1735- 1742.

Wilhem-Filho, D., Bredeston, L. M., Bermudez, M. J. N. & Boveris, A., 1999 . Hydrogen peroxide diffusion in fish gills , in **Biology of tropical fishes**. Edited by A. L. Val and V. M. F. Almeida-Val. INPA, Manaus. Pp253-261.

Williams, D. E., Lech, J. J. & Buhler, D. R., 1998. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. **Mut. Res.** 399: 179-192.

Wootton, R. J., 1992. **Ecology of Teleost Fishes**. 3<sup>a</sup> ed. Chapman & Hall. Londres, 404p.

Yamada, M., Ohta, Y., Sakaki, T., Yabusaki, Y., Ohkawa, H. & Kawato, S., 1999. Dynamic mobility of genetically expressed fusion protein between cytochrome P4501A1 and NADPH cytochrome P450 reductase in yeast microsomes. **Biochemistry**, 38:9465-9470.

Yanev, S. G., Kent, U. M., Roberts, E. S., Ballou, D. P. & Hollenberg, P. F., 2000. Mechanistic studies of cytochrome P4502B1 inactivation by xanthates. **Arch. Biochem. Biophys.** 378:157-166.

Yun, C. H. , Song, M. & Kim, H., 1997. Conformational changes of cytochrome P4501A2 induced by phospholipids and detergents. **J. Biol. Chem.** 272:19725-19730.

Yun, C. H. , Song, M., Ahn, T. & Kim, H., 1996. Conformational changes of cytochrome P4501A2 induced by sodium chloride. **J. Biol. Chem.** 271:31312-31316.

Zafiriou, O. C., 1987. Is sea water a radical solution? **Nature** 325: 481- 482.

Zar, J.H., 1996. **Biostatistical Analysis** 3<sup>a</sup> ed. Edited by Prentice Hall, EUA.

Zikic, V., Stajn, A. S., Ognijjanovic, B. I., Pavloviic, S.Z. & Saicic, Z.S., 1997. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and transaminases in the plasma of carps (*Cyprinus carpio L.*) exposed to cadmium. **Physiol. Res.** 46:391-396.

[http:// www.cetesb.com.br](http://www.cetesb.com.br)

**APÊNDICE I****TABELA RESUMO DOS RESULTADOS**

	<b>TFP</b>	<b>TRITON X-100</b>	<b>TWEEN 80</b>
B5	Diminui na ausência de cofator e aumenta na presença dele	Aumenta muito pouco na ausência de SR. Na presença do cofator há a destruição do citocromo.	Não altera na ausência de cofator. Na presença de SR é totalmente destruído.
P450	Sofre um aumento no momento da adição da droga e decresce ao longo do tempo de incubação, tanto na presença quanto na ausência de SR.	Diminui já com a adição da droga e chega a zero em 6 minutos de incubação, tanto na ausência quanto na presença de SR.	Diminui gradualmente assim que a droga é adicionada ao sistema tanto na presença quanto na ausência de SR
P420	Diminui ao longo do tempo de incubação	Diminui ao longo do tempo de incubação.	Diminui com o tempo de incubação
NCR	Aumenta a atividade proporcional ao aumento das concentrações da droga	Atividade apenas com 0,1 mM de droga. A atividade é igual a zero nas outras concentrações	Atividade apenas com 0,1 mM de droga. A atividade é igual a zero nas outras concentrações
GST	Aumenta atividade proporcional ao aumento da concentração droga.	Aumenta proporcional ao aumento da droga, mas em proporções menores que a TFP.	Aumenta proporcional ao aumento da droga, mas em proporções menores que a TFP.
EROD	Aumenta atividade proporcional ao aumento das concentrações da droga	Diminui, chegando a zero.	Aumenta até 6 minutos, depois permanece inalterada.
SOD	Não altera	Não altera	Não altera
CAT	Não altera	Aumenta	Diminui
GPx	Não altera	Aumenta	Aumenta
Pico de Trp*	Diminui e surge um novo pico em 470nm	Aumenta a intensidade do pico	Diminui a intensidade do pico
Nat-Page**	Não altera	Torna a proteína mais negativa	Torna a proteína levemente mais positiva

Trp – triptofano; Nat-Page – Gel em condições não desnaturantes.

---

## **APÊNDICE II**

### **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Pretende-se, no futuro, dar continuidade no estudo do citocromo P450 de *Prochilodus scrofa* por dois motivos principais: (i) a necessidade de biomarcadores eficazes na detecção dos níveis de poluição ambiental ainda em níveis iniciais e (ii) o uso de um peixe nativo como bioindicador de poluição ambiental, uma vez que a maioria dos trabalhos com P450 no Brasil utiliza-se principalmente de tilápias, um peixe introduzido.

Assim, nossa principal intenção agora é a purificação completa da isoforma CYP1A através de técnicas que não utilizem Triton X-100, uma vez que este trabalho mostrou que este detergente pode ter efeitos inibitórios sobre o P450. Paralelamente a isto também pretendemos fazer a clonagem, expressão e seqüenciamento da CYP1A de *Prochilodus scrofa*, criando assim uma biblioteca de cDNA. Esta isoforma foi escolhida por ser a mais abundante no tecido hepático de peixes e a principal responsável pela metabolização de compostos xenobióticos.

Durante o doutorado pretendemos ainda trabalhar com o princípio ativo de alguns pesticidas largamente utilizados na agricultura brasileira e observar seus efeitos no P450 purificado e recombinante inseridos em uma vesícula de fosfatidilcolina e inserido na membrana microssomal, possibilitando assim o surgimento de novos dados que viabilizem o uso desta proteína como um biomarcador.

Paralelamente a este projeto, pretende-se continuar a trabalhando com P450 em outros organismos, especialmente em anelídeos e mamíferos, como parte integrante do projeto de iniciação científica da aluna Juliana M. Nascimento.

---

## **APÊNDICE III**

### **COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS**

da Silva, M.E.F., Silva, J.A., Nascimento, J.M., Marangoni, S. & Meirelles, N.C., 2001. **Characterization of Cytochrome P450 of a freshwater fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)**. XXXª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Caxambu, MG.

da Silva, M.E.F. & Meirelles, N.C., 2001. **Catalase, Superoxide Dismutase and Gluthatione Peroxidase contents in *Prochilodus scrofa* liver**. XXXª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Caxambu, MG.

da Silva, M.E.F., Degterev, I.A. & Meirelles, N.C., 2000. **Non-Ionic Surfactants interaction with freshwater fish microsomal P450 system**. XVª Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental – FeSBE. Caxambu, MG.

da Silva, M.E.F., Degterev, I.A. & Meirelles, N.C., 2000. **Estimation of Trifluoperazine interaction with freshwater fish microsomal P450 system**. XXIXª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Caxambu, MG.

---

## APÊNDICE IV

### ARTIGOS PUBLICADOS

DEGTEREV, I.A.; MEIRELLES, N.C.; VERCESI, A. E. & DA SILVA, M.E.F., 1999. Redox properties of hepatic cytochromes from Prochilodus scrofa (Curimbatá), a freshwater fish. In: **Biology of tropical fishes**. Edited by A. L. Val e V. M. F. Almeida-Val. INPA, Manaus, AM. Brasil. pp 253-261.

LEITÃO, M.E.S.; AFFONSO, E. G.; DA SILVA, M. E. F.; MEIRELLES, N.C.; RANTIN, F.T.; VERCESI, A. E.; JUNQUEIRA, V.B.C. & DEGTEREV, I. A., 2000. The liver monooxygenase system of Brazilian freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 121C: 29-38.

### ARTIGOS SUBMETIDOS

DA SILVA, M.E.F & MEIRELLES, N.C., 2001. Characterization of enzymatic antioxidant defense in microsomes of Prochilodus scrofa. The role of cytochrome p450 in the production of reactive oxygen species. **Comparative Biochemistry Physiology**.

DA SILVA, M.E.F & MEIRELLES, N.C., 2002. Influence of xenobiotics on the microsomal antioxidant enzyme system of a brazilian fish, Prochilodus scrofa. **Aquatic Toxicology**.