

Variações ambientais no estresse oxidativo e resposta antioxidante de peixes em riachos

Saulo Fernando de Oliveira Afonso¹(IC)*, Carlos Filipe Camilo-Cotrim¹(IC), Max Miller Bicudo dos Reis¹(IC), Fabrício Barreto Teresa¹(PQ), Luciana de Souza Onde¹(PQ)

***saulofernando97@gmail.com.**

1: Universidade Estadual de Goiás - Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo, BR 153, n. 3105, Fazenda Barreiro do Meio, Anápolis - GO. 75132-903. Tel: (62) 3328-1160. Fax (62)3328-1177.

Resumo: O estresse oxidativo, estado de desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e a resposta do sistema de defesa, pode resultar em danos a macromoléculas do organismo, como DNA, proteínas e lipídios. Biomarcadores, respostas do organismo a alterações ambientais, podem ser mensurados para a identificação de agentes estressores. Os peixes são organismos comumente utilizados para a análise de biomarcadores, pois ambientes aquáticos estão sujeitos a diversas alterações, como pH, temperatura, poluição, alteração do volume de água, que causam degradação das condições físico-químicas da água, sendo assim, de extrema importância a análise do efeito da sazonalidade em organismos aquáticos. Este presente trabalho teve como objetivo a avaliação do efeito da sazonalidade sobre biomarcadores de peixes em riachos poluídos, comparando-se a peroxidação lipídica e danos genotóxicos em células de peixes de um riacho receptor de efluentes industriais durante os períodos de seca e chuva, utilizando-se um riacho que não recebe efluentes como padrão de comparação. Os resultados indicam que não houve efeito da estação, mas houve efeito genotóxico para o riacho que recebe efluente, já que o teste de anormalidades nucleares e micronúcleo apresentou resultado significativo ($p < 0,05$). Já o teste de peroxidação lipídica não apresentou resultado significativo para níveis de MDA tanto no fígado quanto nas brânquias ($p = 0,30$ e $p = 0,68$, respectivamente).

Palavras-chave: Biomarcadores. Peixes. Estresse oxidativo. Efluentes. Sazonalidade.

Introdução

O estresse oxidativo é um estado decorrente do desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a resposta do sistema de defesa antioxidante, que pode resultar em danos a macromoléculas como DNA, lipídios e proteínas (BARREIROS et al., 2006; COGO et al., 2009). A identificação das situações que geram estresse oxidativo e a avaliação da resposta dos organismos frente a agentes estressores é importante, principalmente para o monitoramento ambiental (ZHANG, et al., 2012).

Biomarcadores ou indicadores biológicos são respostas do organismo a alterações no meio que podem ser medidas. Como eles indicam uma alteração do estado normal, torna-se uma ferramenta importante para avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos e a influência das alterações ambientais sobre os organismos, como os peixes. Comumente são utilizados como biomarcadores as enzimas antioxidantes, a mensuração do dano oxidativo aos lipídios, além de danos ao DNA (ROVER JUNIOR et al., 2001).

Os ambientes aquáticos estão sujeitos a diversas variações naturais como pH, oxigênio, temperatura, bem como a alterações causadas pela ação antrópica, como poluição. Além disso, esses ambientes também costumam ser submetidos a intensas mudanças no seu volume de água ao longo dos períodos seco e chuvoso (ESPÍRITO-SANTO et al., 2009).

A redução do nível da água no período de seca causa a redução de espaço e a progressiva degradação da qualidade físico-química da água (redução do oxigênio dissolvido, aumento da temperatura e aumento nas concentrações de compostos nitrogenados tóxicos) que podem representar sérias restrições à sobrevivência dos peixes (CHAPMAN; KRAMER et al., 1991). Essa situação pode ser potencializada em ambientes poluídos, como por exemplo, aqueles que recebem efluentes industriais, sendo de extrema importância a avaliação do efeito da sazonalidade sobre os biomarcadores de organismos aquáticos em ambientes poluídos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo comparar a peroxidação lipídica e os danos genotóxicos em peixes de um riacho que recebe efluentes industriais entre os períodos de seca e chuva.

Material e Métodos

Para avaliar o efeito da sazonalidade sobre biomarcadores foram coletadas amostras de peixes da espécie *Astyanax lacustris* (lambari do rabo amarelo). Os animais foram introduzidos em viveiros de nylon e inseridos em trechos de riachos localizados na reserva ecológica do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo da Universidade Estadual de Goiás, sendo um trecho que recebe efluente industrial e um trecho que não recebe efluente industrial (como padrão de comparação), no período da seca e no período chuvoso. O número de viveiros depositados foi igual a cinco no trecho que recebe efluente na chuva, oito no trecho de nascente na chuva, cinco no trecho que recebe efluente na seca e

cinco no trecho de nascente na seca. Parâmetros físico-químicos da água (oxigênio dissolvido, condutividade, pH, temperatura, potencial oxido-redutor) foram medidos nos pontos de coleta. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Estadual de Goiás com protocolo nº 004/2016.

Para a análise da peroxidação lipídica (marcador bioquímico) os tecidos obtidos a partir de brânquias e fígados foram homogeneizados (1:4 massa:volume) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH7,5 e centrifugados a 10.000xg por 30 min. Os níveis de peroxidação lipídica foram mensurados pela presença do produto formado entre o malondialdeído (MDA) e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), por espectrofotometria (ALMEIDA et al., 2003, 2004).

Os danos genotóxicos foram avaliados por meio da análise de micronúcleo e demais anormalidades nucleares (marcador genotóxico). Para a realização do teste, o sangue dos peixes foi coletado por punção venosa da veia caudal com seringa heparinizada. Lâminas de sangue foram confeccionadas pela técnica de esfregaço (extensões sanguíneas) e, posteriormente, fixadas e coradas. O material foi analisado sob objetiva de imersão (100x). Obteve-se a porcentagem de eritrócitos com micronúcleo e outras alterações nucleares pela análise de 3.000 células para um peixe de cada viveiro. As alterações nucleares foram classificadas de acordo com Carrasco (1990).

Para avaliar o efeito dos riachos (que recebe efluentes industriais e a nascente) e das estações em que as amostras foram coletadas (março e abril que corresponde à seca e julho que corresponde à chuva) os valores de MDA, micronúcleo e demais anormalidades nucleares foram comparados por meio da Análise de Variância Fatorial (Two-Way ANOVA).

Resultados e Discussão

As lâminas confeccionadas pela técnica de esfregaço a partir do sangue dos peixes e o MDA das brânquias e do fígado dos animais dos riachos que recebem efluentes e que não recebem efluentes foram analisadas de acordo com o período de coleta do material (seca ou chuva). Na análise descritiva, foram verificados parâmetros físico-químicos da água, obtendo-se valores médios de pH 7,37 (geral), 7,26 (chuva) e 7,48 (seca); médias de oxigênio dissolvido 7,67mg/L (geral), 7,65mg/L (chuva) e 7,68mg/L (seca); médias de condutividade 39,18 μ S (geral), 38,36 μ S (chuva) e 40 μ S (seca); médias de profundidade 45,05cm (geral), 47,40cm (chuva) e

42,70cm (seca); médias de temperatura 21,29°C (geral), 22,60°C (chuva) e 19,72°C (seca); médias de potencial oxido-redutor iguais a 76,46mV (geral), 60mV (chuva) e 92,92mV (seca). Os comprimentos médios dos peixes obtidos foram 63,09mm (geral), 61,54mm (chuva) e 64,26mm (seca). Os tempos médios de exposição dos peixes foram de 73 horas (geral), 69 horas (chuva) e 76 horas (seca).

Não houve efeito da estação para os valores de micronúcleo e demais anormalidades nucleares, bem como para MDA ($p>0,15$ e $p>0,43$, respectivamente). Portanto, não houve variação dos dados em relação ao período em que as amostras foram coletadas.

A frequência de micronúcleos e demais anormalidades nucleares mostrou diferença significativa entre a nascente e o riacho que recebe efluentes industriais ($p=0,01$). Nas análises de MDA, não encontramos diferença significativa tanto para fígado quanto para brânquia entre a nascente e o riacho que recebe efluentes industriais ($p=0,31$ e $p=0,68$ respectivamente).

Considerações Finais

De acordo com os resultados observados, a estação (chuva ou seca) não interfere nas características estruturais das células (dano genotóxico), pois os testes de micronúcleo não apresentam alterações significativas resultantes da exposição a diferentes estações. Entretanto, observam-se alterações resultantes da exposição a efluentes, indicando que análises de micronúcleo e demais anormalidades nucleares podem ser possíveis técnicas para monitoramento ambiental. Os testes de MDA não apresentaram alterações significativas tanto para estação quanto para efluentes, indicando que a peroxidação lipídica não explicita alterações ambientais para os ambientes avaliados. O período de coleta das amostras pode ter influenciado na presença de alterações relevantes decorrentes de estação, pois as amostras de seca, tanto da nascente quanto do riacho que recebe efluentes industriais, foram coletadas durante o início da seca, período no qual a água dos riachos pode apresentar características físico-químicas intermediárias entre as pressupostas de cada estação.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Luciana de Souza Ondeí, pelo profissionalismo e pelo suporte em todas as atividades relacionadas à pesquisa, por meio de orientações e correções; aos meus companheiros de pesquisa, pelo suporte mútuo em atividades laboratoriais e de campo, especialmente a Felipe José Silva Xavier, Suellem Santana Ribeiro, Naiane Ester Rezende Cruz Malagoli, Felipe Bonifácio de Souza, Pedro Paulino Borges e Lucas Guilherme Fonseca. Agradeço também à Instituição e seu corpo docente, pela provisão de materiais e conhecimentos necessários à pesquisa.

Referências

- ALMEIDA, E. A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 135C, n. 3, p. 295–303, 2003.
- ALMEIDA, E. A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Mar Pollut Bull**, v. 49, n. 5-6, p. 386–92, 2004.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.
- CHAPMAN, L. J.; KRAMER, D. L. Limnological observations of an intermittent tropical dry forest stream. **Hydrobiologia**, v. 226, n. 3, p. 153-16, 1991.
- COGO, A. J. D. et al. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.
- ESPÍRITO-SANTO, H. M. V. et al. Seasonal variation in the composition of fish assemblages in small Amazonian forest streams: evidence for predictable changes. **Freshwater Biology**, v. 54, p.536–548, 2009.
- ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, Vol. 24, No. 1, 112-119, 2001.
- ZHANG, W. et al. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. **Journal of Environmental Sciences**, 2012.