

Efeito do Anestésico MS-222 na Enzima Glutationa S-transferase de fígado e brânquia de carpa

EDUARDO RIBEIRO¹; MALUARE CANTELE²; RODRIGO SANTOS³; JULIANO ZANETTE⁴

¹Graduando em Engenharia Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande –
eduardosilveiraribeiro@yahoo.com

²Graduando em Engenharia Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande –
maluarecanete@gmail.com

³Graduando em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Pelotas – rodrigo7887@gmail.com

⁴Professor Adjunto do Departamento de Ciências Biológicas (FURG) – julianozanette @furg.br

1. INTRODUÇÃO

A carpa comum (*Cyprinus Carpio*) é um peixe de grande importância econômica, sendo bastante utilizado em piscicultura atualmente. Além disso, essa espécie vem sendo utilizada também em estudos de toxicologia aquática (GUSTAVINO et al. 2005).

Contaminantes ambientais podem ser biotransformados por enzimas em peixes. As glutationa S-transferases (GSTs) compõem uma família multigênica de enzimas de detoxificação. Diversos substratos são metabolizados pelas GSTs, incluindo xenobióticos tóxicos que são conjugados por estas enzimas (GLISIC et al. 2015). Essas enzimas podem ser extremamente específicas quanto ao seu substrato, e podem ter um ou um grupo de substratos, graças às propriedades de seu sítio ativo, como a de reconhecer grupos químicos de seus substratos e permitir pequenas mudanças para um melhor encaixe do substrato (SCHIMMITT, 2010).

Atualmente, diversos estudos têm sido realizados a fim de se avaliar a eficiência das GSTs como biomarcadores de contaminação ambiental. Podemos atribuir isto a um importante aspecto, que seria a propriedade das GSTs serem induzidas ou inibidas frente à exposição a certos contaminantes (SCHLENK et. al., 2008).

O uso de peixes em experimentação científica requer uma série de procedimentos éticos, como a anestesia precedendo a eutanásia. Dentre as substâncias anestésicas utilizadas, podemos destacar a tricaina metanosulfonada (MS-222), que é um isômero da benzocaína com um radical sulfônico, o que aumenta sua solubilidade em água se comparada a outros anestésicos orgânicos (CHO & HEAT, 2000). Esse anestésico é um dos mais usados em experimentação animal com peixes. Entretanto, não se sabe ao certo, se o mesmo possui alguma influência na atividade de enzimas como as GSTs.

O presente estudo tem como principais objetivos: 1) estimar as concentrações saturante e Km de CDNB para a atividade cinética enzimática das GSTs de carpa; 2) Utilizar um ensaio enzimático competitivo *in vitro* com o MS-222 para verificar se existe alguma interação entre tal composto e a atividade enzimática destas enzimas para o CDNB nas concentrações testadas.

2. METODOLOGIA

Extratos correspondentes à fração S9 das brânquias e fígado de *Cyprinus carpio* foram preparados e utilizados em ensaio enzimático espectrofotométrico utilizando tampão fosfato de potássio com pH 7,0, 1-cloro-2,4-nitrobenzeno

(CDNB) e Glutationa reduzida (GSH) na concentração 0,1 M e pH 7,0 de acordo com KEEN (1976).

Para o ensaio enzimático utilizou-se a temperatura constante em 30 °C, e o tempo de ensaio estabelecido de três minutos. As concentrações de CDNB testadas foram de 0,1 a 1,5 mM de CDNB. Para o ensaio competitivo, concentrações Km e saturante de CDNB foram escolhidas para avaliar o efeito competitivo do anestésico MS-222 (concentrações de 0, 0,5 e 2 mM) na atividade das GSTs. Os valores das médias das atividades enzimáticas foram comparadas utilizando ANOVA -Tukey ($p<0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaios competitivos *in vitro* com a enzima GST, normalmente utilizam apenas a concentração saturante do substrato CDNB em conjunto com concentrações variáveis de outros substratos competidores a serem testados (FERNANDES, 2001). No presente estudo foi realizada uma curva de atividade das GSTs em função do CDNB (Figura 1) a fim de propiciar à escolha de uma concentração saturante, correspondente a concentração necessária para atingir $V_{\text{máx}}$ (velocidade máxima), e outra não-saturante (Km, neste caso) em uma amostra S9 de brânquia de carpa. A constante Km pode ser definida como a concentração necessária para alcançar metade de $V_{\text{máx}}$ (NELSON & COX, 2002). A partir da Figura 1, foram escolhidas as concentrações de 1,2 mM e 0,3 mM de CDNB, como correspondentes a saturante e não-saturante (Km), respectivamente.

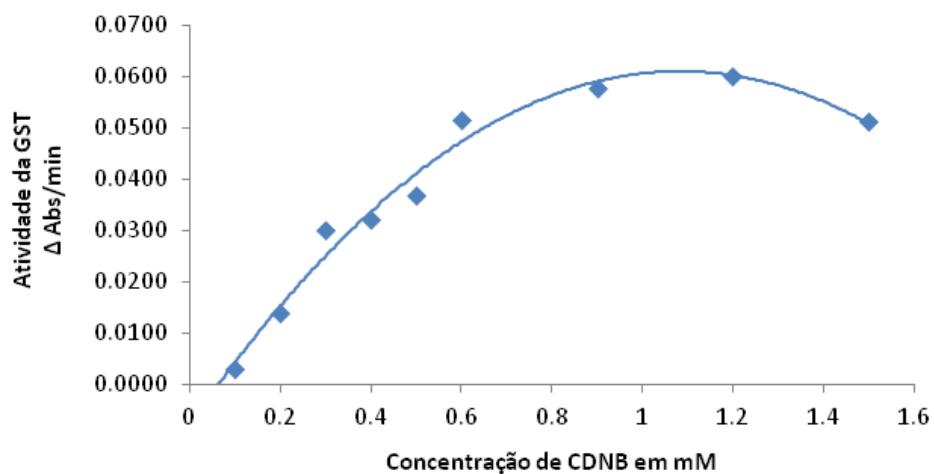


Figura 1: Atividade enzimática das GSTs em brânquias de peixe *Cyprinus Carpio* para diferentes concentrações do substrato CDNB.

A escolha de duas concentrações de CDNB foi realizada no intuito de testar se uma concentração não-saturante de CDNB favorece a competição com MS-222, a fim e tornar o ensaio competitivo mais sensível para utilização com amostras de fígado e brânquia de carpa. Apesar da diferença não ter sido muito expressiva na maior parte dos casos testados (diferentes órgãos e concentrações de MS-222), o uso de concentrações menores de CDNB tornou o teste ligeiramente mais sensível à competição com 0,5mM de MS-222 em fígado: 12,9% de inibição para concentração saturante, em comparação com 24,7% de inibição para concentração não-saturante, assim como à competição com 2 mM de MS-222 em fígado: 54,4% de inibição para concentração saturante, em comparação com e 69,6% para concentração não-saturante. Por outro lado, em

brânquia, a diferença de atividade da GST em condições saturante em comparação com a concentração não-saturante não foi tão notável (25,4% e 51,5% contra 24,6% e 58,4% de inibição, respectivamente). A Figura 2 mostra que o MS-222 causou uma diminuição da atividade das GSTs tanto no extrato S9 de brânquia como de fígado, podendo-se ainda observar que o grau dessa inibição é dependente da concentração utilizada desse anestésico.

A partir destes gráficos, é possível visualizar também uma diferença na atividade enzimática basal entre fígado e brânquia. A atividade enzimática no fígado é cerca de 4 vezes maior que a atividade enzimática na brânquia para a concentração de 1,2 mM de CDNB e cerca de 8 vezes maior na concentração de 0,3 mM.

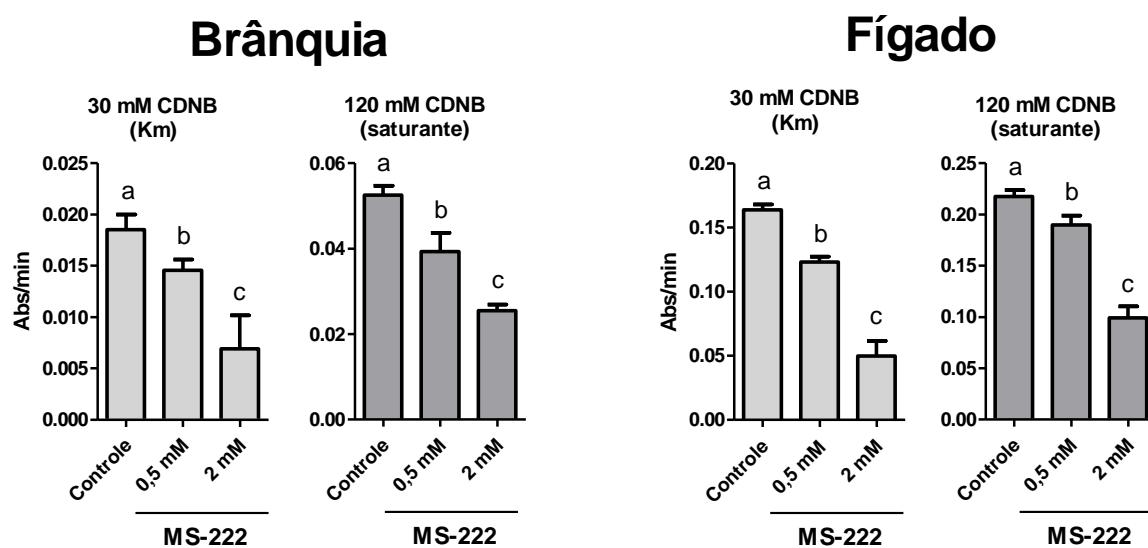


Figura 2: Atividade enzimática do extrato S9 de brânquia e fígado dos grupos controle e expostos a 0,5 e 2 mM de MS-222 nas concentrações de 0,3 e 1,2 mM de CDNB. Letras iguais representam ausência de diferença estatística.

A partir do genoma de peixe-zebra (*Danio rerio*), GLISIC e colaboradores (2015) identificaram aproximadamente 30 genes que codificam para isoformas de GSTs com especificidades para diferentes substratos variáveis e distribuição órgão-específica. Com base nas semelhanças filogenéticas entre esta espécie, com a espécie de estudo (ambas pertencentes a ordem Cypriniformes), espera-se que a carpa comum possua um número similar de isoformas de GSTs. Partindo-se desse pressuposto, pode-se observar diferentes níveis de atividade enzimática graças a alguma interação mais específica entre certos compostos com determinadas isoformas. Uma vez que nosso experimento não nos permite concluir qual o tipo de reação é estabelecida entre as GSTs e o MS-222 (se o mesmo é de fato um substrato das GSTs, ou apenas um regulador de sua atividade enzimática), podemos apenas afirmar que o MS-222 interfere de alguma maneira na atividade enzimática das GSTs. Tal composto também possui uma afinidade maior pelas isoformas das GSTs encontradas no fígado, já que a utilização deste composto causou uma inibição maior neste órgão. Além disso, é interessante frisar que mais pesquisas se fazem necessário, a fim de elucidar melhor os mecanismos assim como as isoformas específicas que tem maior atuação na relação entre o MS-222 e as GSTs.

4. CONCLUSÕES

Através deste experimento pode-se concluir que as concentrações de 0,5 e 2 mM de MS-222 possuem a capacidade de inibir *in vitro* a atividade enzimática das enzimas GSTs de carpa em fígado e brânquia. Portanto, a utilização deste composto precisa ser realizada com cautela em estudos científicos, visto que o MS-222 pode interferir nas análises destas enzimas. Conclui-se também que a utilização de uma concentração menor de CDBN torna o teste competitivo mais sensível. Portanto sugere-se que diferentes concentrações de CDBN sejam testadas em ensaios competitivos para a GST tanto na utilização do ensaio competitivo para identificação de novos substratos (ex.: contaminantes ambientais) como para comparação entre diferentes amostras biológicas (ex.: comparação entre diferentes órgãos ou espécies de organismos aquáticos).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS 222) and clove oil anesthesia effects on physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.31, p.537-546, 2000.

FERNANDES, E. M. A. **Avaliação da Toxicidade de Cianobactérias para Brachydanio rerio utilizando ensaios a diferentes níveis de organização biológica.** 2001. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Curso de pós Graduação em Ecologia Aplicada, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

GLISIC, B.; MALJEVIC, I.; POPOVIC, M.; ZAJA, R.; LONCAR, J.; FENT, K.; KOVACEVIC, R.; SMITAL, T. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v.158, p.50-62, 2015.

GUSTAVINO, B.; BUSCHINI, A.; MONFRINOTTI, M.; RIZZONI, M.; TANCIONI, L.; POLI, P.; ROSSI, C. Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.587(1), p.103-113, 2005.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **J. Biol. Chem.**, v.251(20), p.6183-6188, 1976.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. São Paulo. Sarvier, 2002.

SCHIMITT, S; **Remoção De Corante Disperso Não Fixado De Fibras De Poliéster Através De Uso De Enzimas Oxidoredutases Para Redução De Águas De Lavação.** 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Curso de pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau.

SCHLENK, D.; CELANDER, M.; GALLAGHER, E.; GEORGE, S.; JAMES, M.; KULLMAN, S.; VAN DEN HURK, P.; WILLET, K. Biotransformation in Fishes. In: Di Giulio RT, Hinton DE, editors. **The Toxicology of Fishes**. CRC press; New York: p.153–234, 2008.