

ENSAIO ENZIMÁTICO COMPETITIVO COM GLUTATIONA S-TRANSFERASE DE BRÂNQUIA E FÍGADO DE *Cyprinus carpio* PARA AVALIAÇÃO DA AFINIDADE POR BENZO[a]PIRENO

**MALUARE CANTELE¹; EDUARDO SILVEIRA RIBEIRO²; RODRIGO SANTOS³;
JULIANO ZANETTE⁴**

¹ Universidade Federal do Rio Grande – maluarecantele@gmail.com

² Universidade Federal do Rio Grande – eduardosilveiraribeiro@yahoo.com

³ Universidade Federal de Pelotas – rodrigo7887@gmail.com

⁴ Universidade Federal do Rio Grande – julianozanette@furg.br

1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são contaminantes ambientais derivados da combustão incompleta de compostos de carbono considerados uma classe de substâncias muito importante a ser monitorada e controlada em ambiente aquático. Entre eles, destaca-se o benzo[a]pireno (BaP), um composto carcinogênico e de alta toxicidade (BARTELL, 1996 e VALLACK et al., 1998). As principais fontes responsáveis pela presença de PAHs são fontes naturais (queimadas em florestas, processos geoquímicos) e poluição ambiental (tráfego, sistemas de aquecimento, atividades industriais, vazamentos de óleo), (CAMARGO et al., 2002).

Entretanto, os seres vivos possuem alguns mecanismos de defesa contra estes compostos, como as Glutationa S-transferases (GSTs), que são consideradas enzimas de biotransformação de contaminantes orgânicos, compondo uma família multigênica de enzimas de detoxificação. As GSTs catalizam a conjugação da glutationa com uma variedade de compostos hidrofóbicos, produzindo derivados solúveis em água que podem ser excretados na urina (YASGAR et al., 2010). Existe uma correlação positiva da atividade da GST com a concentração de PAHs em organismos aquáticos (CHEUNG et al., 2001).

O uso de peixes em estudos toxicológicos apresenta dois enfoques: peixes como alvo em estudos ambientais utilizando biomarcadores de contaminação e peixes como modelo para estudos mecanísticos em toxicologia e doenças humanas (HINTON et al., 2009). Existem diversos estudos bioquímicos e fisiológicos com invertebrados aquáticos e peixes devido a fatores como a disponibilidade destes organismos no ambiente, a facilidade com que órgãos/tecidos podem ser utilizados e a uma área que tem se tornado cada vez mais importante, que trata sobre a toxicologia aquática. No presente estudo, foram utilizados fígado e brânquia de carpa comum (*Cyprinus carpio*), pertencente à família *Cyprinidae*. É um peixe muito difundido de água doce e eutrofizada em lagos e grandes rios na Europa e a Ásia e, por tolerar uma grande variedade de condições, pode ser encontrado em várias regiões do mundo.

O presente projeto utilizou técnicas de ensaio enzimático, a fim de realizar um ensaio competitivo e evidenciar o nível de interação existente entre as enzimas de GST de *Cyprinus carpio* com o benzo[a]pireno.

2. METODOLOGIA

Extratos correspondentes à fração citosólica 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 Glutathiona reduzida (GSH) na concentração 0,1 M e pH 7,0 de acordo com KEEN (1976). A formação do conjugado foi monitorado em 314 nm durante 3 minutos a 30 °C.

Para a escolha das concentrações de CDNB utilizadas, realizou-se um ensaio com várias concentrações que variaram de 0,1 a 1,5 mM (Figura 1).

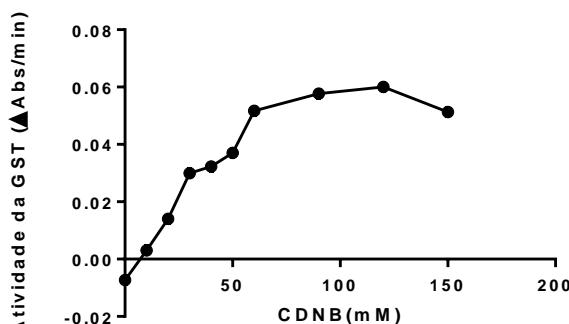


Figura 1. Concentrações de CDNB de 0,1 a 1,5 mM para determinação das concentrações saturante e K_m .

Para o ensaio competitivo, concentrações K_m (0,3 mM) e saturante (1,5 mM) de CDNB foram escolhidas para avaliar o efeito competitivo com BaP (concentrações de 0, 9,9 e 39,6 μ M) na atividade da GST. O BaP utilizado no ensaio competitivo foi diluído em dimetilsulfóxido 99,9% (DMSO). Para realizar o branco (concentração 0 de BaP), foi utilizado o mesmo volume de DMSO que o utilizado nos testes com as outras concentrações de BaP. As médias de atividade enzimática para as diferentes condições testadas foram analisados por ANOVA - Tukey ($p<0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O V_{max} é o limite para que tende v_0 quando a concentração do substrato tende para infinito (concentração saturante). O K_m é a concentração de substrato para o qual o valor de v_0 é metade do valor de V_{max} , e é uma medida da afinidade do substrato em relação à enzima (quanto maior for o seu valor menor será a afinidade) (FONTES, 1996). Dessa forma, as concentrações de CDNB definidas para as análises foram as concentrações K_m (0,3 mM) e saturante (1,2 mM). Com isso, para as duas concentrações realizaram-se os testes com as concentrações de BaP de 0, 9,9 e 39,6 μ M, com as amostras de brânquia e fígado (Figura 2).

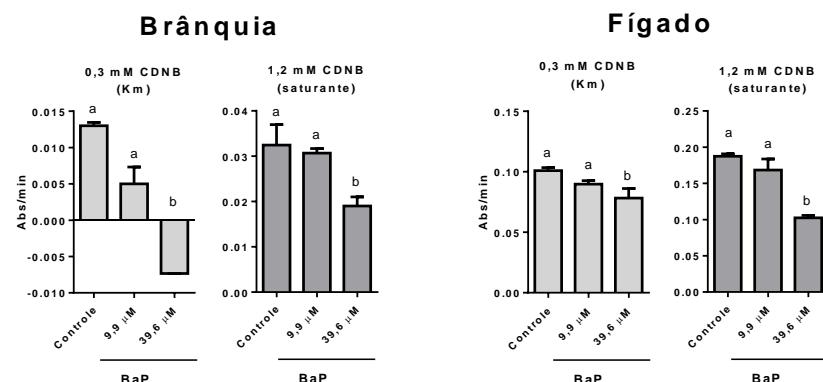


Figura 2. Atividade enzimática da GST para diferentes concentrações de CDNB e de BaP para brânquia e fígado de carpa.

Foi observado que a maior concentração de BaP utilizada causou uma inibição da GST nas duas concentrações de CDBN em brânquia e em fígado, enquanto a menor concentração de BaP não apresentou inibição em nenhuma das análises. Isso significa que a resposta inibitória é dose-dependente para as concentrações de BaP.

Em brânquias, na concentração de CDBN de 0,3 mM, apenas a concentração de BaP de 39,6 μ M apresentou inibição (123%), a concentração de 9,9 μ M de BaP não apresentou (52%) (Figura 2A). Na concentração de 1,2 mM de CDBN, ocorreu o mesmo. A concentração de BaP de 9,9 μ M não inibiu (5%) e a de 39,6 μ M inibiu (45%) (Figura 2B).

Em fígado, o mesmo foi observado. Na concentração de CDBN de 0,3 mM, apenas a concentração de BaP de 39,6 μ M apresentou inibição (22%), a concentração de 9,9 μ M de BaP não apresentou (11%) (Figura 2C), e na concentração de 1,2 mM de CDBN, a concentração de BaP de 9,9 μ M não inibiu (10%) e a de 39,6 μ M inibiu (45%) (Figura 2D).

Pode-se supor que esta inibição na atividade para o substrato CDBN seja causada por haver competição com o BaP ao nível de sítio catalítico das enzimas GST.

A maior concentração do substrato CDBN testada (1,2 mM) resultou em uma maior atividade enzimática nos grupos controle. Em concentrações não-saturantes de CDBN, o ensaio competitivo com um segundo substrato fica mais sensível, o que é perceptível pela maior inibição causada pelo segundo substrato nestas condições.

Também é possível observar que a atividade enzimática basal no fígado é maior, o que indica que o fígado possui maiores níveis de GSTs ou que possui isoformas com maior afinidade pelo composto, se comparado com as brânquias.

Ensaios *in vitro* revelaram eficácia na inibição de GST de *Brugia malayi* na concentração de 0,001 mg/mL dos seguintes compostos quimioterapêuticos: linalol (98%), alfa-pineno (90%), estricrina (87%), vanilina (85%), piperina (80%), isoeugenol (62%), curcumina (57%), beta-cariofileno (40%), ácido cinâmico (27%), capsaicina (20%), citronelol (20%) e geraniol (17%) (AZEEZ, 2011). Visto que a resposta inibitória é dose-dependente para as concentrações de BaP e depende dos órgãos utilizados, e que a capacidade inibitória variou entre 5% e 123% em decorrência desses aspectos, torna-se difícil estabelecer uma comparação inibitória.

Ensaios competitivos enzimáticos são importantes para evidenciar o nível de interação existente entre as enzimas de GST com o substrato de interesse. Com isso, podem ser testados e identificados vários substratos em diferentes espécies e órgãos de animais. Até onde se tem conhecimento, este é o primeiro estudo a reportar o uso de ensaio enzimático competitivos com GST na espécie de peixe *Cyprinus carpio*, para identificação de possíveis substratos desta enzima. Outro aspecto importante que não havia sido devidamente explorado em estudos anteriores é o uso de uma concentração não-saturante nas análises e o teste com BaP, ideia esta que pode ser útil em estudos futuros que requerem maior sensibilidade do método enzimático competitivo com GSTs para identificação de novos substratos da enzima.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o contaminante BaP inibe a atividade da GST de forma dose-dependente. Portanto, o presente estudo sugere 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

- AZEEZ, S.; BABU, R. O.; AYKKAL, R.; NARAYANAN, R. Virtual screening and in vitro assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione-S-transferase of filarial nematodes. **Journal of Molecular Modeling**, Calicut, v. 18, n. 1, p. 151-163, 2011.
- BARTELL, S. M. Some thoughts concerning quotients, risks, and decision making, Human and Ecological Risk Assessment. **Spogli Riviste**, Amherst, v.2, n.1, p. 25-29, 1996.
- CAMARGO M. C. R.; TOLEDO M. C. F. Chá-Mate E Café Como Fontes De Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) Na Dieta Da População De Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimententos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2002.
- CHEUNG, C. C. C.; Zheng G.J.; Li A.M.Y.; Richardson B.J.; Lam P.K.S. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology**, Hong Kong, v. 52, n. 3-4, p. 189-203, 2001.
- FONTES, R. **Enzimas e Cinética Enzimática**. 1996.
- HINTON, D.E., HARDMAN, R.C., KULLMAN, S.W., LAW, J.M., SCHMALE, M.C., WALTER, R.B., WINN, R.N., YODER, J.A. Aquatic animal models of human disease: Selected papers and recommendations from the 4th Conference. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, Durham, v. 149, n. 2, p. 121-128, 2009.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p.6183-6188, 1976.
- VALLACK H. W.; BAKKER D. J.; BRANDT I.; LUNDÉN E. B.; BROUWER A.; BULL K. R.; GOUGH C.; GUARDANS R.; HOLOUBEK I.; JANSSON B.; KOCH R.; KUYLENSTIERNO J.; LECLOUX A.; MACKAY D.; MCCUTCHEON P.; MOCARELLI P.; RAALMAN R. D. F. Controlling persistent organic pollutants. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Wageningen, v. 6, p. 143-175, 1998.
- YASGAR A.; SHULTZ J.; ZHOU W.; WANG H.; HUANG F.; MURPHY N.; ABEL E. A.; DIGIOVANNI J.; INGLESE J.; SIMEONOV A. A High-Throughput 1,536-Well Luminescence Assay for Glutathione S-Transferase Activity. **Assay and Drug Development Technologies**, v.8, n. 2, p. 200-211,2010.