

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**EFEITOS DA ANOXIA AMBIENTAL E DA RECUPERAÇÃO DA  
ANOXIA SOBRE O BALANÇO OXIDATIVO NO CARANGUEJO**

*Chasmagnathus granulata*

**Dissertação de Mestrado**

**UBIRAJARA O. DE OLIVEIRA**

**Porto Alegre, 2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**EFEITOS DA ANOXIA AMBIENTAL E DA RECUPERAÇÃO DA  
ANOXIA SOBRE O BALANÇO OXIDATIVO NO CARANGUEJO**

*Chasmagnathus granulata*

**UBIRAJARA O. DE OLIVEIRA**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia.

Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro e Ana, e aos meus irmãos pela criação e ensinamentos, e à minha esposa e filhos pelo carinho, amor e paciência.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos R. Kucharski, com muito admiração, pelo exemplo de pessoa e profissional, pela dedicação, paciência e amizade;

À Profa. Dra. Roselis S. M. da Silva pela assistência na realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Adriane Belló Klein por compartilhar seu profundo conhecimento científico. Por disponibilizar equipamentos e produtos de seu laboratório para a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Maria Flávia M. Ribeiro pelas sugestões e auxílio técnico na realização deste trabalho. Por disponibilizar equipamentos e produtos de seu laboratório. Mas principalmente pelo seu companheirismo;

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo H. B. Júnior por compartilhar seu profundo conhecimento científico. Por disponibilizar equipamentos de seu laboratório para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Álvaro Reischak de Oliveira por compartilhar seu profundo conhecimento científico, por ter despertado em mim o interesse pela Fisiologia e por ter confiado no meu trabalho;

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Em especial à Tânia Regina, Aléx Sander, Jaqueline e a Roberta pelo auxílio na realização dos experimentos;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada: Márcia, Ana, Vanessa, Alessandra, Letícia, Gabriela, Fabíola, Mariana, Carmem, Clara, Paula, Lúcia, Rafael, Guilherme, Glauco, Matheus, Rodrigo, Humberto e Rogério, pela amizade e convivência;

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia que colaboraram na minha formação;

Às secretárias do PPG-Fisiologia Uiraçara e Ana pelo auxílio. Em especial à Mírian e a Alice pelo inestimável carinho;

À CAPES e a FAPERGS pelo auxílio financeiro.

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	III
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	6
<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
1. <i>COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS</i> .....	30
2. <i>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</i> .....	30
2.1. <i>PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS</i> .....	31
2.2. <i>DOSAGEM DE PROTEÍNA</i> .....	32
2.3. <i>LIPOPEROXIDAÇÃO</i> .....	33
2.4. <i>CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)</i> .....	35
2.5. <i>ENZIMAS ANTIOXIDANTES</i> .....	37
2.6. <i>WESTERN BLOT E IMUNODETECÇÃO</i> .....	40
2.7. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> .....	42
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	42
<b>TRABALHO 1</b> .....	49
<b>EFEITOS DA ANOXIA AMBIENTAL E DA FASE DE RECUPERAÇÃO SOBRE O BALANÇO OXIDATIVO NAS BRÂNQUIAS DO CARANGUEJO CHASMAGNATHUS GRANULATA</b> .....	50
<b>RESUMO</b> .....	51
<b>PALAVRAS-CHAVE</b> .....	51
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	52
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
2.1. <i>Coleta e Manutenção dos Animais</i> .....	54
2.2. <i>Procedimentos Experimentais</i> .....	55
2.3. <i>Preparo dos Homogeneizados</i> .....	55
2.4. <i>Determinação das Proteínas</i> .....	56
2.5. <i>Enzimas Antioxidantes</i> .....	56
2.6. <i>Capacidade Antioxidante Total (TRAP)</i> .....	57
2.7. <i>Lipoperoxidação</i> .....	58
2.8. <i>Análise Estatística</i> .....	59
<b>3. RESULTADOS</b> .....	59
3.1. <i>Defesas Antioxidantes Enzimáticas</i> .....	59
3.2. <i>Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas</i> .....	60
3.3. <i>Produtos da Lipoperoxidação</i> .....	61
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	66
<b>TABELAS</b> .....	68

<b>FIGURAS</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	72
<b>TRABALHO 2</b> .....	75
<b>BALANÇO OXIDATIVO E IMUNODETECÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E GST NO HEPATOPÂNCREAS DE CARANGUEJOS CHASMAGNATHUS GRANULATA SUBMETIDOS À EVENTOS DE ANOXIA/REOXIGENAÇÃO</b> .....	76
<b>RESUMO</b> .....	77
<b>PALAVRAS-CHAVE</b> .....	77
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	78
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	80
2.1. <i>Coleta e Manutenção dos Animais</i> .....	80
2.2. <i>Procedimentos Experimentais</i> .....	80
2.3. <i>Preparo dos Homogeneizados</i> .....	81
2.4. <i>Determinação das Proteínas</i> .....	82
2.5. <i>Enzimas Antioxidantes</i> .....	82
2.6. <i>Western blot e Imunodeteção</i> .....	83
2.7. <i>Capacidade Antioxidante Total (TRAP)</i> .....	83
2.8. <i>Lipoperoxidação</i> .....	84
2.9. <i>Análise Estatística</i> .....	85
<b>3. RESULTADOS</b> .....	85
3.1. <i>Atividade das Enzimas Antioxidantes</i> .....	85
3.2. <i>Concentração das Enzimas Antioxidantes (Western blot e Imunodeteção)</i> .....	86
3.3. <i>Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas</i> .....	86
3.4. <i>Produtos da Lipoperoxidação</i> .....	87
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	87
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	92
<b>TABELAS</b> .....	93
<b>FIGURAS</b> .....	94
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	97
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	100

## **INTRODUÇÃO GERAL**

Os primeiros organismos vivos que surgiram na Terra viviam sob uma atmosfera de muito pouco oxigênio ( $O_2$ ), eles eram essencialmente anaeróbios.

O  $O_2$  surgiu em quantidades significativas na atmosfera da Terra há aproximadamente 2,5 bilhões de anos, graças à evolução de uma primitiva bactéria fotosintética (progenitora da cianobactéria moderna) que produziu um sistema capaz de captar elétrons da água ( $H_2O$ ). Elas quebram a molécula de  $H_2O$  para obter o hidrogênio necessário para realizar as reduções metabólicas, com isso liberam o  $O_2$  para a atmosfera. O oxigênio é hoje o elemento mais abundante na crosta terrestre (53% prevalência atômica), seu percentual na atmosfera é de 21% com uma pressão barométrica ao nível do mar de 760 mmHg de mercúrio, e gera uma pressão parcial em torno de 159 mmHg. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NELSON & COX, 2000; STARR & TAGGART, 1998).

Os organismos anaeróbios de hoje são presumivelmente descendentes daqueles organismos primitivos que evolutivamente adaptaram-se para resistirem ao aumento nos níveis do  $O_2$  atmosférico, retraindo-se para ambientes onde o  $O_2$  não penetre ou desenvolvendo sistemas de defesa antioxidante para protegerem-se contra a toxicidade do  $O_2$  (LUTZ & STOREY, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A maioria dos organismos evoluíram de modo a utilizarem o  $O_2$  para uma eficiente produção de energia. A energia biologicamente utilizada, na forma de ATP, é obtida através da fosforilação oxidativa e da cadeia de transporte de elétrons, na qual o  $O_2$  é o aceptor final de elétrons. A extração de energia a partir dos nutrientes sempre envolve a completa ou parcial oxidação do substrato, no

curso do qual elétrons ou átomos de hidrogênio são transferidos consecutivamente para um ou mais aceptores ativados. O aceptor primário sempre necessita ser reoxidado, enquanto o aceptor final acumula-se numa forma reduzida. O  $O_2$  é o aceptor terminal ideal porque o produto da sua redução é a água, que pode acumular-se sem perigo ao organismo (URICH, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A evolução da eficiência na produção de energia levou ao aparecimento de seres multicelulares complexos, que também necessitaram de sistemas para assegurar que o  $O_2$  pude-se ser distribuído através do organismo. Uma vantagem destes é que a distribuição do  $O_2$  para as células pode ser controlada: por exemplo a maioria das células no corpo humano nunca são expostas à completa pressão parcial do  $O_2$  atmosférico (LUTZ E STOREY, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Apesar das vantagens do uso do  $O_2$  na produção de energia, existem evidências de que o mesmo cause danos aos organismos (animais, plantas e bactérias). O tempo de sobrevivência é inversamente proporcional ao logaritmo da pressão de  $O_2$ , e tem uma relação aproximadamente linear, desde protozoários até coelhos. Organismos expostos a  $O_2$  hiperbárico podem ter seu crescimento inibido, apresentarem pulmões severamente danificados, sofrerem toxicidade aguda no sistema nervoso central, apresentarem mutações gênicas e freqüentemente podem morrer (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Nos organismos anaeróbios o  $O_2$  inibe diretamente algumas enzimas, como por exemplo as nitrogenases, enzimas que fixam nitrogênio ( $N_2$ ) e são inativadas pela oxidação de componentes essenciais de seu sítio ativo. Elas catalisam a redução do  $N_2$  atmosférico para amônia ( $NH_3$ ), que é essencial para o

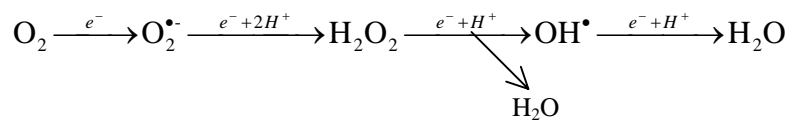


crescimento dos organismos em ambientes pobres em compostos nitrogenados. O  $O_2$  também inibe o crescimento das plantas, pois compete com o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) diminuindo sua fixação a ribulose bifosfato carboxilase, enzima que catalisa a reação do  $CO_2$  com uma hexose do carbono 5 (ribulose 1,5-bifosfato) gerando ácido fosfoglicérico durante a fotossíntese (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NELSON & COX, 2000).

Nos organismos aeróbios, dada a intensidade na qual os efeitos tóxicos do  $O_2$  se desenvolvem, é muito pouco provável que os mesmos sejam causados por uma inibição enzimática provocada pelo  $O_2$ , devido a esta inibição ser muito lenta e limitada, pois a maioria das suas enzimas não são afetadas pelo  $O_2$ . Deste modo, a toxicidade do  $O_2$  não é causada pela própria molécula, mas pela formação de produtos intermediários parcialmente reduzidos, altamente reativos e perigosos, conhecidos como espécies ativas de oxigênio (EAO) (NEWSHOLME & LEECH, 1984; MENEHINI, 1987).

As EAO são formadas em aproximadamente 5% de todo o processo das oxidações biológicas, dentre os quais, podemos destacar a formação de ATP na mitocôndria, onde o  $O_2$  recebe 4 elétrons e é reduzido a  $H_2O$ . Entretanto, em razão da configuração eletrônica do  $O_2$  este processo é realizado em etapas (Figura 1), pois é quimicamente impossível adicionar 4 elétrons simultaneamente à molécula de  $O_2$ . Na cadeia de transporte de elétrons, o complexo citocromo oxidase catalisa essas etapas, mantendo as EAO fortemente ligadas ao seu centro ativo até elas serem totalmente convertidas em  $H_2O$ . Este complexo apresenta esta capacidade devido a possuir dois grupamentos heme e dois cobre, que têm alta afinidade pelo  $O_2$  e seus intermediários, contidos em suas subunidades (STRYER, 1996; BOVERIS, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE,

1999; NELSON & COX, 2000). Contudo, alguns componentes da cadeia de transporte de elétrons deixam escapar uns poucos elétrons, que reagem diretamente com o  $O_2$ , enquanto passam a maioria deles para o próximo componente da cadeia. Uma elevada concentração de  $O_2$  e danos na organização mitocondrial aumentam a intensidade de fuga de elétrons, aumentando assim, a formação das EAO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



$O_2^{\bullet -}$  - radical superóxido

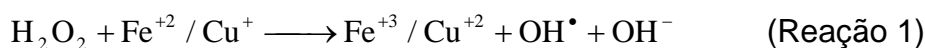
$H_2O_2$  - peróxido de hidrogênio

$OH^{\bullet}$  - radical hidroxil

**Figura 1:** Formação das EAO, a partir da redução do  $O_2$ .

A adição de um elétron à molécula de  $O_2$  forma o radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) que é o primeiro intermediário da redução univalente do oxigênio, e a partir deste são formadas as demais EAO. O superóxido é formado em quase todas as células aeróbias (YU, 1994; BOVERIS, 1998). Células fagocitárias como neutrófilos, monócitos e macrófagos produzem uma grande quantidade de  $O_2^{\bullet -}$  durante os processos inflamatórios, com o objetivo de destruir as bactérias invasoras. Outro exemplo são os linfócitos, que reconhecem as células do próprio organismo que se tornaram tumorais ou foram infectadas por parasitas, fungos, bactérias ou vírus, provocando sua lise por meio da produção de EAO (MENECHINI, 1987).

O superóxido ao receber mais um elétron forma o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que é o segundo intermediário da redução univalente do oxigênio. Este processo é conhecido como dismutação (onde a mesma espécie é oxidada e reduzida), e a velocidade desta reação pode ser aumentada pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  também pode ser produzido diretamente, pela redução bivalente do  $\text{O}_2$ . Este processo é realizado por oxidases encontradas nos peroxissomas tais como: a D-aminoácido oxidase, a uricase, a alfa-hidroxiácido oxidase e a glicolato oxidase (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um agente fraco, tanto redutor quanto oxidante e, é geralmente pouco reativo; mas em concentrações entre 10 e 100  $\mu\text{M}$  é tóxico à maioria das células, causando oxidação de biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA. Contudo, esses efeitos tóxicos não são mediados apenas pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , este pode atravessar rapidamente as membranas celulares e, reagir com íons de ferro e de cobre (reação de Fenton, 1894) (reação 1), para formar o radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), que é extremamente reativo, capaz de causar extensivo e indiscriminado dano biológico, apesar de seu curto tempo de meia-vida. O  $\text{OH}^\bullet$  pode também ser gerado através da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na presença de íons metálicos (reação de Haber-Weiss, 1934) (reação 2), como também, pela luz ultravioleta induzindo a fissão homolítica da ligação O-O no  $\text{H}_2\text{O}_2$  produz  $\text{OH}^\bullet$  (reação 3). Outras fontes de  $\text{OH}^\bullet$  são: ozônio, decomposição do ácido peroxinitroso, radiação ionizante e ultra-som (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



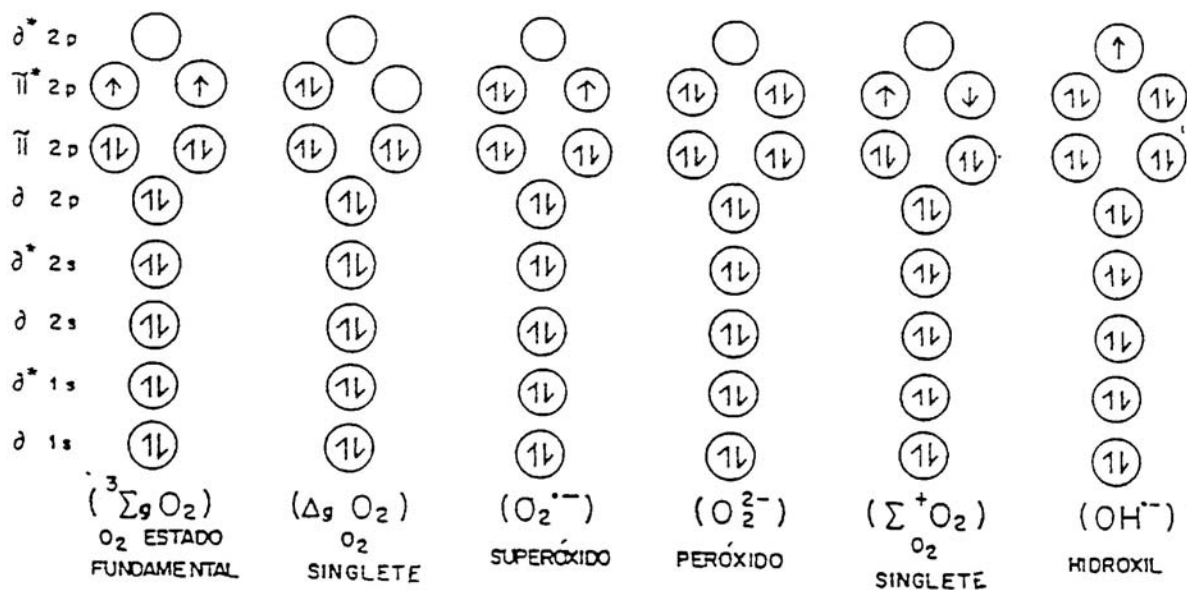


Cada EAO tem sua própria característica, mostrando diferente reatividade e duração (meia-vida). A maioria tende a ser muito reativa e instável, porém algumas são relativamente estáveis como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e o  $\text{OH}^\bullet$  diferem do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pois apresentam um elétron desemparelhado, em seu orbital mais externo, sendo também denominados de radicais livres (DEL MAESTRO, 1980; MENEGHINI, 1987; YU, 1994).

Os radicais livres são definidos como “qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula” (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Eles são formados pela perda ou ganho de um elétron de uma substância não-radical, ou quando uma ligação covalente é quebrada por fissão homolítica, onde cada um dos átomos fica com um elétron (BOVERIS, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O  $\text{O}_2$  no estado fundamental é um birradical, pois apresenta dois elétrons desemparelhados, porém com spins paralelos, o que dificulta sua reação com outras espécies não-radicais, tornando-o mais estável quimicamente (YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

As formas de oxigênio "singlets" (Figura 2), não possuem restrição de "spin" e por isso são muito mais reativas que o  $\text{O}_2$  no estado fundamental, podendo causar danos às células. O oxigênio "singlet"  $\Sigma$  é um birradical, pois possui dois elétrons desemparelhados; já o oxigênio "singlet"  $\Delta$  não é um radical livre, pois não apresenta elétrons desemparelhados (DEL MAESTRO, 1980; MENEGHINI, 1987; YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



**Figura 2:** Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Além dos mecanismos descritos aqui, existem outras fontes enzimáticas de EAO no organismo, como a atividade das ciclooxygenases, lipooxygenases, xantina oxidase, aldeído oxidases; e outras não-enzimáticas como a auto-oxidação de catecolaminas, semiquinonas, flavinas e ferridoxinas, além das reações catalisadas por metais de transição (DEL MAESTRO, 1980; Mc CORD, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Formam-se também *in vivo*, espécies ativas de nitrogênio (EAN), de carbono (EAC), de enxofre, entre outras; que assim como as EAO, classificam-se em radicais e não- radicais (tabela 1), e também causam danos biológicos.

**Tabela 1:** Espécies ativas de oxigênio (EAO), espécies ativas de nitrogênio (EAN) e espécies ativas de carbono (EAC) (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE,1999).

	<b>Radicais</b>	<b>Não-Radicais</b>
<b>EAO</b>	Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de Hidrogênio, $H_2O_2$
	Hidroxil, $OH^{\bullet}$	Ácido Hipocloroso, $HOCl$
	Hidroperoxil, $HOO^{\bullet}$	Ozônio, $O_3$
	Oxigênio Singlet sigma, $\Sigma^+O_2$	Oxigênio Singlet delta, $\Delta gO_2$
<b>EAN</b>	Óxido Nítrico, $NO^{\bullet}$	Ácido Nitroso, $HNO_2$
	Dióxido de Nitrogênio, $NOO^{\bullet}$	Cátion Nitrosil, $NO^+$
		Ânion Nitrosil, $NO^-$
		Tetróxido de Nitrogênio, $N_2O_4$
		Trióxido de Nitrogênio, $N_2O_3$
		Peroxinitrito, $ONOO^-$
		Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$
		Cátion Nitrônio, $NO_2^+$
		Alquil Peroxinitrito, $ROONO$
	Nitril Clorido, $NO_2Cl$	
<b>EAC</b>	Peroxil, $ROO^{\bullet}$	
	Alcoxil, $RO^{\bullet}$	

Para neutralizar as EAO e as EAN os organismos adaptaram-se evolutivamente, criando sistemas de defesas, chamados de antioxidantes (STOREY, 1996ab; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Um antioxidante é definido como “qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação deste substrato, que pode ser lipídio, proteína, DNA ou outra molécula oxidável” (HALLIWELL , 1997).

A composição das defesas antioxidantes varia de tecido para tecido, e de célula para célula num mesmo tecido. Assim, como os mecanismos de proteção do fluido extracelular são diferentes do ambiente intracelular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

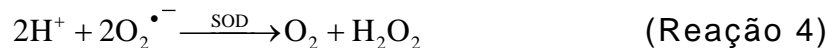
Os mecanismos de ação dos antioxidantes são diversos, e podem incluir remoção do oxigênio presente no meio, varredura das EAO ou seus precursores, inibição da formação das EAO, quelação de metais que catalisam sua formação, indução do aumento da geração de antioxidantes endógenos, entre outros mecanismos; envolvendo muitas vezes integração funcional de vários destes componentes (HALLIWELL, 1997).

As substâncias que agem na fase de iniciação ou de propagação da lipoperoxidação (ataque das EAO/EAN sobre os lipídeos de membranas), removendo as EAO e formando um composto menos reativo, são chamadas de “scavengers”. As substâncias antioxidantes que têm a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, são denominadas de “quenchers” (SIES & MURPHY, 1991; HALLIWELL, 1997).

O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimáticos e não-enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O componente enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo de intermediários como o  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$ . Existem também defesas secundárias que impedem a propagação da lipoperoxidação, e terciárias que são enzimas de reparo dos danos já instalados (YU, 1994).

A enzima superóxido dismutase (SOD) atua especificamente na remoção do  $O_2^{\bullet-}$ . Ela catalisa a dismutação de dois ânions radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (reação 4). A velocidade desta reação é  $10^4$  vezes maior que a

velocidade da dismutação espontânea em pH fisiológico (YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



A SOD é classificada em três tipos distintos: SOD cobre e zinco ( $\text{SOD}_{\text{CuZn}}$ ) presente em quase todas as células eucarióticas, em maior quantidade no citosol, mas pode estar presente também, nos peroxissomas, nos lisossomas, no núcleo, no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria, e no fluído extracelular; SOD manganês ( $\text{SOD}_{\text{Mn}}$ ) presente em bactérias, plantas e animais, esta localizada na matriz mitocondrial; e SOD ferro ( $\text{SOD}_{\text{Fe}}$ ) que ocorre em bactérias, algas e plantas superiores (YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A SOD está presente em quase todos os organismos vivos, é um sistema de defesa essencial para a sobrevivência em condições aeróbias. O reconhecido papel deletério do superóxido durante os eventos isquêmicos, sugere que a SOD pode ter uso clínico potencial. O que levou à pesquisa de SOD miméticos, pois a SOD humana tem curta meia-vida (< 10 min.), e não penetra nas células (GOLDSTEIN & CZAPSKI, 1996). Além disso, a modulação da atividade da  $\text{SOD}_{\text{CuZn}}$  extracelular pode ser utilizada no tratamento de doenças vasculares, como a aterosclerose (LUOMA *et al.*, 1998).

Outra enzima antioxidante importante e que atua na remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , é a catalase (CAT). Essa catalisa diretamente a decomposição do peróxido de hidrogênio, transformando-o em água e oxigênio (reação 5). A CAT é altamente



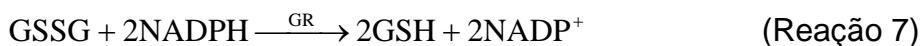
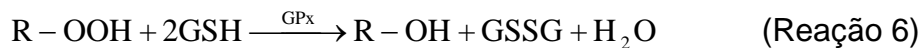
específica, pois atua apenas em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila (CHANCE, 1979).



Em animais, a CAT está presente em todos os principais órgãos do corpo, sendo especialmente concentrada no fígado. A CAT localiza-se preferencialmente nos peroxissomas, pois estas organelas apresentam muitas enzimas que geram  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tais como glicolato oxidase, urato oxidase e flavoproteínas desidrogenases envolvidas na  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, uma via metabólica que também ocorre na mitocôndria dos animais. A atividade da CAT pode variar nos diferentes tipos de célula; órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético são mais susceptíveis aos danos oxidativos, pois estes apresentam uma menor concentração da CAT do que o fígado. Mas, nesses órgãos, um importante mecanismo de proteção pode ser a difusão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  para o sangue, onde a catalase eritrocitária poderá decompô-lo (YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

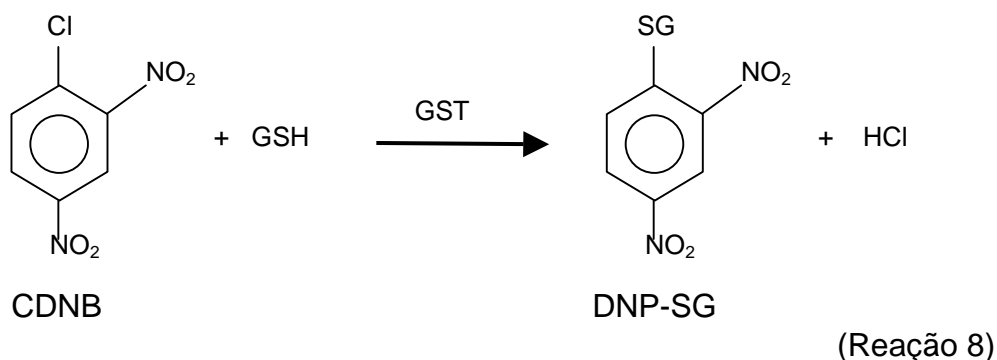
Outra enzima que também atua na remoção de peróxidos é a glutathione peroxidase (GPx), presente em animais, plantas e em muitas bactérias aeróbias. Ela catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de hidroperóxidos orgânicos, através da oxidação do grupamento sulfidril da glutathione reduzida (GSH), formando glutathione oxidada (GSSG) (reações 6). Neste processo, forma-se uma ligação dissulfeto (GS-SG) pois os grupamentos sulfidril da GSH doam dois átomos de hidrogênio para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água. A GSSG pode ser reduzida por ação da enzima glutathione redutase (GR), utilizando o

NADPH como doador de elétrons e, com isto, reciclando a GSH (reações 7) (YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



Existem dois tipos de glutatona peroxidase: uma selênio dependente que utiliza-o como cofator, encontra-se no citosol e na matriz mitocondrial, e outra selênio independente, que encontra-se apenas no citosol. A glutatona peroxidase apresenta alta atividade no fígado e nos eritrócitos, enquanto nos pulmões, nos olhos e no músculo esquelético sua atividade é mais restrita (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

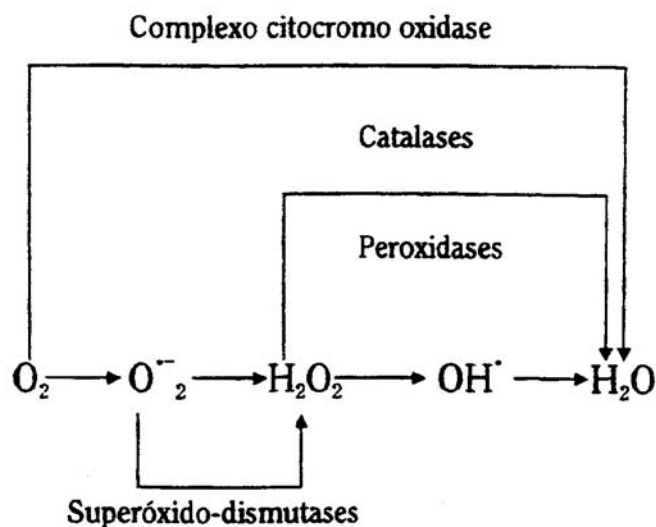
As enzimas glutatona-S-transferases (GSTs) são outro grupo de enzimas com um importante papel fisiológico, tanto em animais como em plantas, no metabolismo de herbicidas, pesticidas e xenobióticos. Elas catalisam a conjugação destes compostos com o grupamento tiol (-SH) da glutatona, neutralizando assim seus sítios eletrofílicos, transformando-os em produtos hidrossolúveis e facilmente metabolizáveis (reação 8) (HABIG *et al.*, 1974). Algumas GSTs apresentam uma atividade semelhante à GPx selênio independente, conjugando hidroperóxidos orgânicos com a GSH, formando assim GSSG e álcoois. As GSTs não conjugam hidroperóxido inorgânico (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; SALINAS & WONG, 1999).



As GSTs também metabolizam compostos como clorofórmio, nitratos orgânicos, bromobenzeno, aflotoxin, DDT, naftalina e paracetamol; além de aldeídos citotóxicos produzidos durante a lipoperoxidação, como o 4-hidroxinonenal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

As células eucarióticas apresentam múltiplas isoformas de GSTs citosólicas e ligadas à membrana, cada qual com distinta especificidade pelo substrato e outras propriedades (SALINAS & WONG, 1999).

A figura 3 resume os mecanismos de defesa enzimáticos usados para desviar e prevenir o acúmulo dos intermediários reativos da redução do oxigênio molecular. Evitando o acúmulo do  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$  as enzimas antioxidantes indiretamente previnem a produção do radical  $OH^{\bullet}$ , que é extremamente reativo e contra o qual não há defesas enzimáticas (FRIDOVICH, 1978).



**Figura 3:** Mecanismos de defesas enzimáticas contra EAO (Modificado de DEL MAESTRO, 1980).

O componente não-enzimático inclui antioxidantes hidrofílicos (vitamina C, glutathiona, indóis, catecóis) e antioxidantes lipofílicos (carotenóides, tocoferóis, bioflavonas) (SIES & MURPHY, 1991; SIES, 1997).

Entre os antioxidantes hidrofílicos, a vitamina C ou ascorbato é muito importante pois atua como “scavenger” do  $O_2^{\bullet -}$  e do  $OH^{\bullet}$ , além de reciclar a vitamina E (YU, 1994; MARKS *et al.*, 1996). A glutathiona também é importante pois serve como cofator para as enzimas GPx e GSTs, está envolvida no metabolismo da vitamina C, pode quelar íons cobre e diminuir sua habilidade para gerar radicais livres, previne a oxidação dos grupamentos tióis (-SH) das proteínas e ligações cruzadas, além de estar envolvida numa série de outros processos metabólicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Entre os antioxidantes lipofílicos, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) age como “scavenger” de radicais peroxil ( $ROO^{\bullet}$ ) transformando-os em tocoferil quinona, inibindo assim, as reações em cadeia da lipoperoxidação (SIES & MURPHY,

1991; MARKS *et al.*, 1996). O  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A) é um potente “quencher/scavenger” de oxigênio “singlets”, mas o quanto importante ele pode ser para os animais saudáveis é incerto (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Muito do potencial antioxidante dos micronutrientes necessita ainda ser esclarecido: biodisponibilidade, captação pelos tecidos, metabolismo, e atividades biológicas (SIES & MURPHY, 1991; SIES, 1997).

Outros compostos, como aminoácidos livres, peptídeos e proteínas, têm baixa atividade antioxidante específica, mas quando presentes em altas concentrações, podem contribuir significativamente na proteção contra as EAO (DRÖGE, 2002).

Como vimos, os sistemas de defesa antioxidante protegem o organismo dos efeitos danosos das EAO, mas para a manutenção da homeostase do organismo, deve haver um constante equilíbrio entre os pró-oxidantes (EAO/EAN) e as defesas antioxidantes (GILLHAM *et al.*, 1997). Quando este equilíbrio é rompido em favor dos agentes oxidantes ocorre um estado de estresse oxidativo (SIES, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), que pode ser causado por aumento na produção de EAO e/ou por diminuição na capacidade antioxidante, podendo favorecer inúmeros processos patológicos (DRÖGE, 2002).

Muitas são as evidências de que as EAO provocam ou influenciam inúmeros processos orgânicos degenerativos, como a artrite, a catarata, o enfisema, o mal de Parkinson, a lesão isquêmica, a porfiria aguda intermitente, o diabetes experimental (induzido por aloxano ou por estreptozotocina), o câncer, o envelhecimento, entre outros processos. Os mecanismos pelos quais as EAO participam nesses processos não são perfeitamente claros, mas elas podem

causar danos em todos os tipos de biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas e DNA (MENEHINI, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

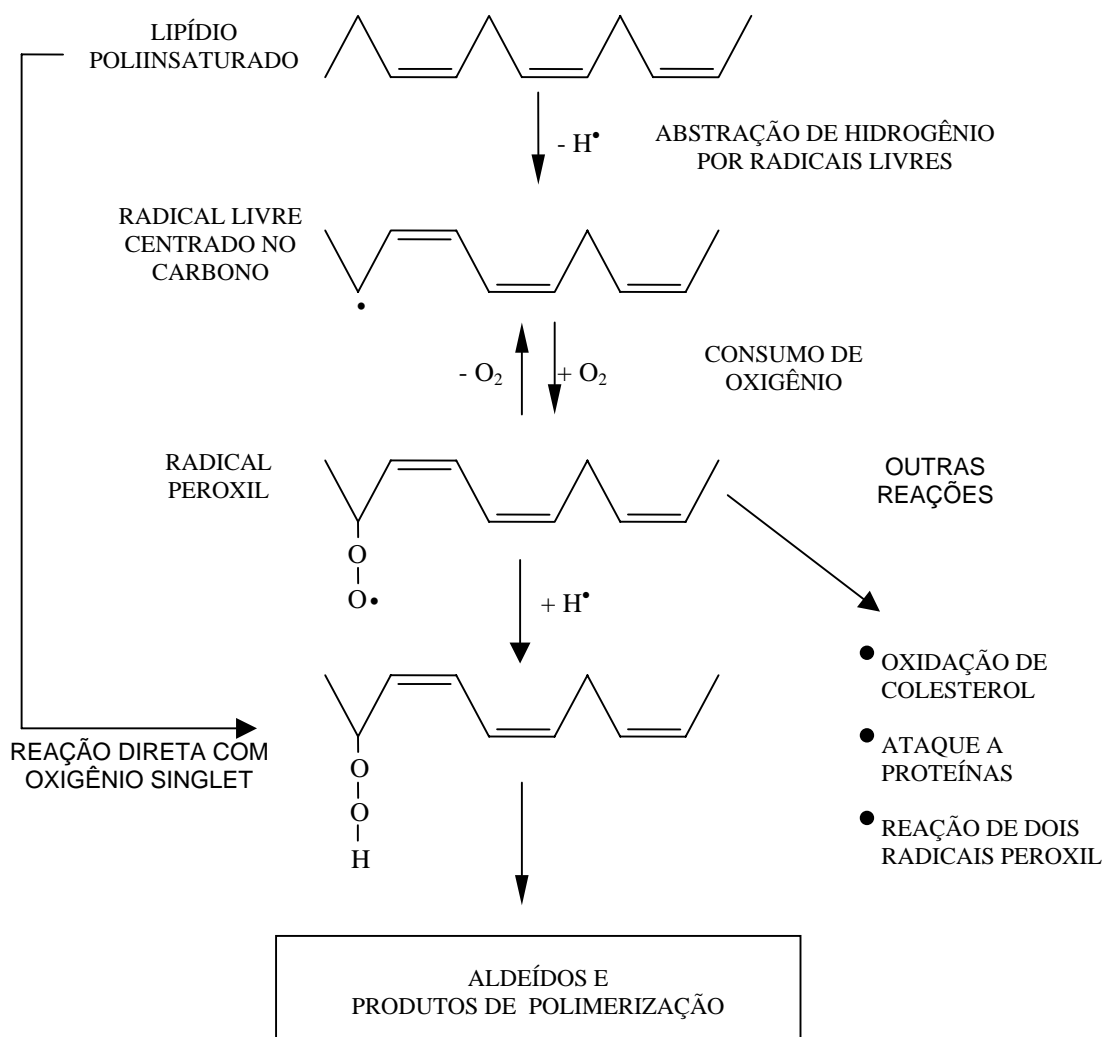
As EAO atacam as membranas lipídicas, num processo denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). As membranas celulares são mais susceptíveis à LPO, pois contêm uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e grupamentos tióis (-SH) das proteínas (MENEHINI, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A lipoperoxidação é um processo sucessivo e fisiológico que envolve não somente a renovação das membranas celulares, mas também a biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos (MENEHINI, 1987). Entretanto, o estresse oxidativo aumenta a LPO e provoca dano severo nas membranas celulares, produzindo alterações na fluidez e na seletividade, além de alterações em suas proteínas (receptores e canais iônicos) (YU, 1994).

A lipoperoxidação pode ser dividida em três estágios: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, o radical hidroxil ou o oxigênio "singlet" ataca a molécula orgânica abstraindo-lhe um átomo de hidrogênio, gerando um radical centrado no carbono, que tende a se estabilizar por um rearranjo molecular formando um dieno conjugado, que rapidamente combina-se com o oxigênio e produz o radical peroxil. O radical peroxil inicia a fase de propagação da LPO removendo um átomo de hidrogênio de um lipídio adjacente, gerando um lipoperóxido e um outro radical centrado no carbono; esta reação repete-se inúmeras vezes numa reação em cadeia. Na fase de terminação dois radicais peroxil reagem entre si formando um tetróxido instável, que decompõem-se em oxigênio "singlet" e carbonilas excitadas, que emitem luz e podem ser detectadas por quimiluminescência. A decomposição do lipoperóxido por

aquecimento ou por exposição a metais de transição gera aldeídos tóxicos (como o malondialdeído), que podem ser medidos espectrofotometricamente (figura 4) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; WHEATLEY, 2000).

Os danos provocados pelo estresse oxidativo nas proteínas podem variar amplamente. As EAO podem causar oxidação nos grupamentos tióis (-SH) das proteínas, que podem levar a alterações nas suas funções, fragmentação química e/ou maior susceptibilidade para ataque proteolítico. As EAO podem também causar alterações no DNA, ao oxidar bases púricas e pirimídicas (FRAGA *et al.*, 1994; YU, 1994; DRÖGE, 2002).



**Figura 4:** Representação esquemática da reação da LPO (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Entre as lesões provocadas pelo estresse oxidativo a lesão do tipo isquemia-reperfusão têm despertado imenso interesse entre os pesquisadores, devido ao seu envolvimento em complicações nos transplantes de órgãos, no infarto do miocárdio e nos acidentes vasculares cerebrais (“stroke”) (DRÖGE, 2002).

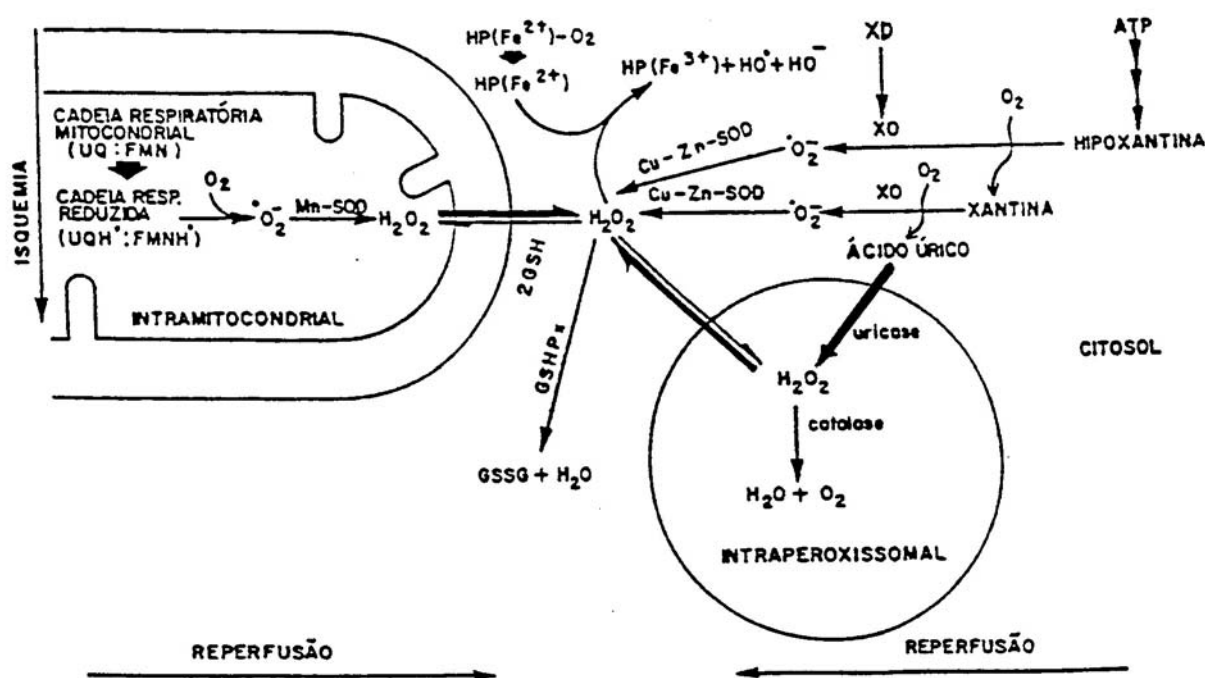
A isquemia ocorre quando um tecido é privado de fluxo sanguíneo, resultando em hipóxia. O tecido hipóxico sobrevive por um período de tempo variável dependendo do tecido em questão e da espécie animal. Em mamíferos, períodos prolongados de isquemia causam danos irreversíveis nas células (BAST *et al.*, 1991; LUTZ & STOREY, 1997). Os tecidos respondem à isquemia de várias maneiras; inicialmente as respostas incluem aumento da atividade da glicogenólise e da glicólise, levando à formação de lactato e subsequente acidose. Ocorre uma depleção nos níveis de ATP, levando ao acúmulo de AMP, que é degradado à hipoxantina. Além disso, a enzima xantina desidrogenase (XD) é convertida à xantina oxidase (XO) por oxidação dos grupos –SH ou por proteases dependentes de cálcio (BAST *et al.*, 1991).

No momento em que o tecido é reperfundido, a hipoxantina reage com o  $O_2$  na presença da XO para formar xantina; esta é convertida em ácido úrico também pela XO, formando radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (McCORD, 1985). A mitocôndria é a principal organela de formação de  $O_2^{\bullet-}$  durante a reperfusão. Pois na isquemia, a ausência de  $O_2$  leva os componentes da cadeia respiratória ao máximo de redução, o que aumenta o vazamento de elétrons durante a reperfusão, com conseqüente aumento na produção de  $O_2^{\bullet-}$  (JONES, 1985; FERREIRA *et al.*, 1988). Este, combinando-se com o  $H_2O_2$  na presença de metais de transição, forma o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), principal causador de dano celular



(figura 5). Deste modo, a isquemia seguida de reperfusão ao invés de melhorar a lesão tecidual, agrava-a ainda mais. Esse fenômeno é conhecido como “paradoxo do oxigênio” (HEARSE *et al.*, 1977; BELLÓ *et al.*, 1996).

Este paradigma, têm importantes implicação para a fisiologia comparada, visto que, muitos animais vivem em ambientes que se caracterizam por extremas flutuações na concentração de oxigênio (WINSTON & DI GIULIO, 1991).



**Figura 5:** Hipóteses das seqüências de eventos bioquímicos relacionados à formação de EAO durante isquemia-reperfusão (segundo BELLÓ *et al.*, 1996).

Os animais aquáticos captam o O<sub>2</sub> dissolvido na água que é cerca 3% do valor atmosférico, esta dissolução depende da temperatura, da salinidade da água, assim como, da decomposição da matéria orgânica presente na mesma (GÄDE, 1984; SCHMIDT-NIELSE, 1996; LUTZ & STOREY, 1997).

Muitos invertebrados marinhos intertidais de respiração branquial freqüentemente experimentam períodos cíclicos de privação de O<sub>2</sub> com as marés, mas têm excelente capacidade para anaerobiose facultativa, o que possibilita a eles sobreviverem por dias ou semanas sem oxigênio (BROOKS & STOREY, 1997).

Entre os vertebrados, essa habilidade é encontrada em duas espécies de peixes ciprinídeos, a carpa cruciana (*Carassius carassius*) e o peixe-dourado (*Carassius auratus*), e em duas espécies de tartarugas de água-doce (*Chrysemys picta* e *Trachemys scripta elegans*), que tornaram-se modelos de vertebrados no estudo da resistência à anoxia. Essas espécies de tartarugas mergulham rotineiramente e também hibernam submersas, podendo sobreviver por 3-4 meses privadas de oxigênio (STOREY, 1996a; WILLMORE & STOREY, 1997; LUSHCHAK *et al.*, 2001).

Adicionalmente, outros animais resistem a períodos cíclicos de normóxia e hipóxia; como os gastrópodes terrestres, que durante os períodos de estiva retraem-se em suas conchas, fechando-as com o epifragma (envoltório mucoso), evitando assim a perda excessiva de água; e os animais mergulhadores, que experimentam profunda hipóxia em muitos de seus órgãos, causada por ajustes circulatórios que redirecionam o sangue oxigenado aos músculos esqueléticos e ao cérebro (STOREY & STOREY, 1990).

Ao enfrentarem essas situações de estresse ambiental, os organismos adotam uma estratégia em comum, para maximizar o tempo de sobrevivência, denominada depressão metabólica. Eles são capazes de diminuir seus níveis metabólicos para valores entre 10 e 30% de seu estado metabólico de repouso (LUTZ & STOREY, 1997; HOCHACHKA & LUTZ, 2001).

Entretanto, todas estas situações de reduzida disponibilidade e/ou consumo de oxigênio, fazem com que a transição de volta para o estado metabólico normal, seja acompanhada por um rápido e grande aumento na captação, concentração e consumo de O<sub>2</sub> pelos organismos. Essa transição é um análogo funcional a situação de reperfusão que ocorre após a lesão isquêmica em mamíferos (WINSTON & DI GIULIO, 1991; STOREY, 1996b).

Portanto, os animais que naturalmente enfrentam situações de ampla variação na disponibilidade de O<sub>2</sub> necessitam de estratégias que os permitam lidar com as conseqüências da reintrodução do O<sub>2</sub>, em seus sistemas. Essas estratégias incluem: a) manutenção das altas defesas antioxidantes constitutivas; b) aumento das defesas antioxidantes sob condições de anoxia, na antecipação de sua necessidade quando o O<sub>2</sub> é reintroduzido; c) grande tolerância às EAO ou mecanismos eficientes para sua remoção (PANNUNZIO & STOREY, 1998).

Adicionalmente, o estudo das estratégias utilizadas pelos organismos expostos a constantes variações na disponibilidade de O<sub>2</sub> podem trazer relevantes informações para a saúde humana (WINSTON & DI GIULIO, 1991). Nos últimos anos, essas estratégias vem sendo estudas em moluscos, peixes, anfíbios e répteis (STOREY & STOREY, 1990; HERMES-LIMA & STOREY, 1996; LUTZ & STOREY, 1997; WILLMORE & STOREY, 1997; PANNUNZIO & STOREY, 1998; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; LUSHCHAK *et al.*, 2001).

O peixe-dourado *Carassius auratus* e a rã leopardo *Rana pipiens* quando submetidos a períodos de anoxia, apresentam um aumento significativo na atividade de enzimas antioxidantes específicas (ex.: catalase e Se-GPx) e manutenção da atividade de muitas outras. Estas, retornam aos níveis de controle durante a recuperação/reoxigenação. A rã leopardo não apresenta alterações nos

níveis de lipoperoxidação (TBA-RS) durante os períodos de anoxia e de recuperação; entretanto, o peixe-dourado apresenta um aumento significativo da lipoperoxidação (dienos conjugados) durante o período de recuperação (HERMES-LIMA & STOREY, 1996; LUSHCHAK *et al.*, 2001).

Por outro lado, o gastrópode marinho *Littorina littorea* e a tartaruga de água-doce *Trachemys scripta elegans* expostos a períodos de anoxia, apresentam uma diminuição significativa na atividade das enzimas antioxidantes (ex.: catalase, SOD, GPx, GR e GST), que tendem a retornar aos seus níveis normais durante a recuperação. E tanto o gastrópode quanto a tartaruga não apresentaram alterações nos níveis de lipoperoxidação (TBA-RS e dienos conjugados) durante os períodos experimentais (WILLMORE & STOREY, 1997; PANNUNZIO & STOREY, 1998).

Apesar das inúmeras espécies investigadas, muito pouco se sabe sobre as estratégias adotadas pelos crustáceos, em situações de anoxia/reoxigenação.

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) é uma espécie tipicamente estuarina, que habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais desde o litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul no Brasil, e ao longo de toda a costa do Uruguai até o Golfo de São Martin na Argentina (BOSCHI, 1964).

Os marismas são áreas resultantes da alternância entre períodos irregulares de total cobertura com água e outros de plena exposição do substrato. Dependendo da combinação de fatores oceanográficos e meteorológicos, os eventos de recobrimento ou de plena exposição do substrato podem durar vários dias. Desta forma, os organismos estuarinos e lagunares são submetidos

freqüentemente a um elevado estresse ambiental, tolerando amplas variações das características físico-químicas do ambiente (ODUM, 1985).

Em seu habitat, o caranguejo *Chasmagnathus granulata* permanece longos períodos fora d'água, sendo considerado um animal tipicamente semi-terrestre (MAÑE-GARZON *et al.*, 1974), muito embora o sistema respiratório desses animais esteja pouco adaptado à respiração aérea (SANTOS *et al.*, 1987).

Na lagoa de Tramandaí (RS/Brasil), em pântanos salgados ocupados por populações de caranguejos *Chasmagnathus granulata*, verificou-se que o teor de oxigênio dissolvido na água varia de 2,78 à 11,78 mgO<sub>2</sub>/L e a salinidade de 0,22 à 34 ‰. Porém, durante o inverno, os níveis de O<sub>2</sub> dissolvido nas habitações subterrâneas atingem valores muito próximos de zero. As habitações subterrâneas assumem um importante papel na ecofisiologia deste caranguejo, visto que diminuem as amplas variações de salinidade e de temperatura, mas não aquelas do teor de O<sub>2</sub> dissolvido na água (TURCATO, 1990).

Caranguejos *Chasmagnathus granulata* submetidos a períodos de anoxia ambiental apresentam um aumento nos níveis de glicose e de L-lactato na hemolinfa (GONÇALVES, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2001), e uma diminuição na atividade locomotora e na frequência cardíaca (GONÇALVES, 1993). Em caranguejos *Carcinus maenas* além destas adaptações, também foi observada uma diminuição em torno de 80% na produção de calor (HILL *et al.*, 1991). Todas estas alterações remontam a um estado de depressão metabólica (LUTZ & STOREY, 1997). Entretanto, durante a fase de recuperação em condições de normoxia, os crustáceos demonstram um aumento do consumo de O<sub>2</sub> que é proporcional ao grau e ao tempo de exposição a anoxia/hipóxia (TEAL & CAREY,

1967; THOMPSON & PRITCHARD, 1969; BRIDGES & BRAND, 1980; TAYLOR & SPICER, 1987; HILL *et al.*, 1991; GONÇALVES, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

## **OBJETIVOS**

---

Em função da rotineira exposição a eventos de isquemia/reperfusão, como também, pelas alterações metabólicas apresentadas pelo caranguejo *Chasmagnathus granulata*, torna-se relevante analisar quais são as estratégias utilizadas pelo mesmo, ao enfrentar essas situações de estresse oxidativo. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito da anoxia ambiental e de diferentes períodos de reoxigenação sobre o balanço oxidativo no caranguejo *Chasmagnathus granulata* (brânquias e/ou hepatopâncreas), através dos seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar o estresse oxidativo (lipoperoxidação);
- b) Medir a atividade das enzimas antioxidantes;
- c) Determinar a concentração das enzimas antioxidantes;
- d) Verificar a capacidade antioxidante não-enzimática;

Os dois trabalhos que serão apresentados nesta dissertação de mestrado, estão formatados para uma futura versão em inglês, com adaptações para publicação no periódico “***Comparative Biochemistry and Physiology***”.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS**

Foram utilizados, caranguejos machos adultos da espécie *Chasmagnathus granulata* no estágio de intermuda, coletados de um estuário às margens da Lagoa de Tramandaí/RS. Os caranguejos foram capturados manualmente e transportados em caixas plásticas com água do próprio local. Os animais foram coletados de acordo com a legislação ambiental brasileira (Portaria 332/90 IBAMA).

No laboratório, os animais foram submetidos a um choque hiposmótico (água destilada) por 24 horas, a fim de limpar o conteúdo estomacal e eliminar possíveis parasitas. Posteriormente, foram selecionados animais com carapaças entre 2,5 e 3 cm de diâmetro (para minimizar os efeitos da idade e do tamanho dos mesmos); que foram transferidos para aquários com oxigenação constante, salinidade de 20‰, temperatura média 25°C, fotoperíodo de 12/12 horas claro/escuro e alimentados com carne bovina *ad libitum*, ao final da tarde (período de maior atividade dos animais em seu habitat) durante 15 dias.

### **2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

Após os 15 dias de aclimação, um grupo de animais foi utilizado como controle (CT). Outro grupo de animais (grupo anoxia - AX) foi colocado em um aquário previamente aerado com gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) durante 20 minutos. Após serem colocados no aquário, os animais permaneceram por mais 20 minutos ainda sob constante aeração de N<sub>2</sub>, totalizando 40 minutos de aeração com N<sub>2</sub>

para obtenção de anoxia total. A  $pO_2$  foi monitorada durante todo o período experimental através de um oxímetro (WPI – modelo OXEL-1/ISO<sub>2</sub>), mantendo-se em 0% de O<sub>2</sub>.

Após este período, o aquário foi hermeticamente fechado com filme de PVC, e a partir desse momento foram contadas 8 horas de anoxia ambiental.

Decorrido os períodos experimentais (grupos controle e anoxia), os animais foram imediatamente crioanestesiados e retiradas amostras do hepatopâncreas (HP), das brânquias anteriores (BA) e das brânquias posteriores (BP) para as determinações bioquímicas. As brânquias foram divididas em anteriores e posteriores pois exercem funções distintas: as brânquias anteriores estão envolvidas na respiração e as posteriores na osmorregulação (SIEBERS *et al.*, 1982; GILLES & PEQUEUX, 1986; LUCU, 1993).

A fase de recuperação, após 8 horas de anoxia, foi realizada colocando-se novamente parte dos caranguejos, em aquário com oxigenação constante, onde permaneceram durante 20 e 40 minutos. Ao final de cada período da fase de recuperação foram realizados os mesmos procedimentos experimentais, citados para os grupos CT e AX.

## **2.1. PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS**

### **2.1.1. Homogeneizados para TBA-RS , TRAP, SOD (Autoxidação do Pirogalol) e Western Blot**

Os hepatopâncreas e as brânquias foram rapidamente retirados, pesados e homogeneizados por 40 segundos em um homogeneizador Ultra-Turrax, com KCl 1,15% (7 ml/g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10  $\mu$ L/ml de KCl adicionado). O PMSF



é um inibidor de proteases, e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas das quais a atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 8.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24, Du Pont Instruments, EUA), e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -70°C para as dosagens posteriores (modificado de LLESUY *et al.*, 1985).

### **2.1.2. Homogeneizados para CAT, GST e SOD (Adrenalina-Adrenocromo)**

Os hepatopâncreas e as brânquias foram rapidamente retirados, pesados e homogeneizados por 40 segundos, com Tris-HCl 20 mM e Sacarose 0,5 M (7 ml/g de tecido), mais PMSF 100 mM em isopropanol (10 µL/ml de tampão). A sacarose cria uma diferença de molaridade, que provoca a lise celular. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 8.000 rpm, o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -70°C para as dosagens posteriores.

## **2.2. DOSAGEM DE PROTEÍNA**

As proteínas foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976), para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

- ✓ Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma): 25 mg em 12,5 ml de etanol 95%;
- ✓ Ácido Ortofosfórico 85% (Merck): 25 ml

Para preparar a solução de Bradford misturou-se 12,5 ml de “Coomassie Brilliant Blue” com 25 ml de Ácido Ortofosfórico e completou-se o volume com água destilada para 250 ml. Esta solução foi conservada refrigerada e ao abrigo da luz.

Inicialmente colocou-se 1 ml da solução de Bradford nas cubetas do espectrofotômetro para fazer a leitura zero de absorvância. A seguir, colocou-se na cubeta de leitura 1 ml da solução de Bradford e 20 µL da amostra de tecido.

Após a estabilidade da cor (coloração azulada), era realizada leitura da absorvância à 595 nm em espectrofotômetro marca Varian modelo Cary.

O cálculo foi feito a partir de uma curva de calibração, onde utilizou-se um padrão de albumina bovina (1 mg/mL).

## **2.3. LIPOPEROXIDAÇÃO**

### **2.3.1. Dienos Conjugados**

A determinação dos dienos conjugados vem sendo amplamente utilizada como um índice dos primeiros eventos da lipoperoxidação. A detecção espectrofotométrica dos dienos conjugados reflete a presença de lipoperóxidos num extrato lipídico.

Os hepatopâncreas e as brânquias foram rapidamente retirados, pesados e homogeneizados em frascos de vidro por 40 segundos, com clorofórmio/metanol 2:1 (V/V) (15 ml/g de tecido), e centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm. A fase líquida foi misturada em ácido sulfúrico/H<sub>2</sub>O 1:2.000 (V/V) em igual volume e novamente centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm. A fase superior foi aspirada, e a fase inferior aerada com N<sub>2</sub> para a obtenção dos lipídeos, que foram pesados e redissolvidos em hexano, obtendo uma concentração final de 2 mg/ml.

O conteúdo de dienos conjugados nos lipídeos foi determinado pela segunda derivada espectrofotométrica, pegando-se a diferença entre os picos de absorbância a 240 e 233 nm, que representam respectivamente, os *cis-trans* e *trans-trans* estereoisômeros de dienos conjugados. A segunda derivada vem sendo utilizada para minimizar a interferência de outras biomoléculas que absorvem na mesma região espectral, melhorando quantitativamente e qualitativamente a relativa intensidade dos picos de absorção. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de absorbância  $d^2A/mg$  de lipídeos, onde  $d^2A$  representa a altura do pico de absorbância (FOLCH *et al.*, 1957; CORONGIU & MILIA, 1983; CORONGIU *et al.*, 1989).

### **2.3.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)**

Esta técnica é muito utilizada para medir a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com o malondialdeído e outros aldeídos, produtos característicos do estágio terminal da lipoperoxidação. A técnica consiste em aquecer o material biológico na presença de ácido tiobarbitúrico em um meio ácido, que forma um composto corado (base de Schiff), que pode ser medido espectrofotometricamente.

Para o ensaio, adicionou-se 0,25 ml de homogeneizado em 0,75 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (P/V) (para desnaturar as proteínas e acidificar o meio de reação), centrifugou-se à 3.000 rpm por 5 minutos. Retirou-se 0,5 ml do sobrenadante, que foi misturado a 0,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. Esta mistura, foi então aquecida por 15 minutos a 100°C e em

seguida resfriada no gelo. Após, resfriada foi feita a leitura da absorbância à 535 nm.

Os resultados são expressos em nmoles de TBA-RS/mg de proteína (BUEGE & AUST, 1978).

#### **2.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)**

A determinação da TRAP baseia-se na formação de um radical que emite luz, e a presença de antioxidantes no meio inibe esta emissão. Essa técnica mede a concentração total dos antioxidantes não-enzimáticos hidrossolúveis presentes na amostra.

A técnica é baseada na decomposição do 2,2' Azo-bis (2-amidinopropano) dihidroclorato, que gera radicais peroxil por decomposição espontânea. Sua decomposição é dependente da temperatura, quanto maior a temperatura maior a geração de radicais livres. Esses, por sua vez, oxidam o luminol (fonte de quimiluminescência) que gera um pico de emissão de luz, facilmente detectado pelo contador. No entanto, se tivermos antioxidantes presente no meio de reação eles irão neutralizar os radicais livres, e assim diminuir a emissão de luz. Más, assim que os antioxidantes forem consumidos, a emissão de luz volta a aumentar.

O período de tempo em que a emissão de luz fica inibida, é definido como tempo de indução ( $T_i$ ), e é utilizado para avaliar a quantidade relativa de antioxidantes presentes na amostra. A TRAP é obtida, comparando-se o  $T_i$  da amostra com o  $T_i$  de uma quantidade conhecida do antioxidante trolox (vitamina E hidrossolúvel).

Para realizar as medidas utilizou-se um contador de radioatividade beta (LKB "Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer"-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura e com os viais de cintilação mantidos na penumbra, para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. E foram utilizados os seguintes reagentes:

- ✓ Tampão fosfato 50 mM, pH 7,4;
- ✓ 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloro 0,5% em tampão fosfato;
- ✓ Luminol 1mg/mL em NaOH 0,1N;
- ✓ Trolox 319  $\mu$ M em tampão fosfato.

Para a realização do ensaio utilizou-se 3 ml da solução de Azo, na qual foi adicionado 10  $\mu$ L de luminol e fez-se uma leitura basal ( $\geq 50.000$  cps). Após, foi adicionada a amostra (30  $\mu$ L do homogeneizado das brônquias ou 20  $\mu$ L do homogeneizado de hepatopâncreas) e realizava-se contagens até se obter uma emissão semelhante à leitura basal. Foram feitas também, duas leituras utilizando-se Trolox nas quantidades de 5  $\mu$ L e 10  $\mu$ L, para fazer uma curva padrão. Os resultados foram expressos em mM de Trolox /  $\mu$ L de amostra (LISSI *et al.*, 1992; EVELSON *et al.*, 2001).

## 2.5. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### 2.5.1. Superóxido Dismutase (SOD)

Uma das técnicas utilizadas neste trabalho para determinar a atividade da SOD, baseia-se na sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol. O pirogalol em meio básico, gera radicais superóxidos e se auto-oxida. Portanto, a SOD presente na amostra dismuta os radicais superóxidos inibindo assim, a auto-oxidação do pirogalol. A oxidação do pirogalol forma um produto colorido, que é detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de oxidação do pirogalol, quanto menor a velocidade de oxidação maior é atividade da enzima. Os valores desta inibição, dados em percentagem, foram transformados em unidades relativas de SOD utilizando-se um fator de calibração. Para isso, construiu-se uma curva padrão com concentrações de SOD conhecida. Sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. Utilizou-se os seguintes reagentes:

- ✓ Tampão Tris-base 50 mM com EDTA 1 mM (pH 8,2 com HCl);
- ✓ Pirogalol 24 mM (em 10 mM de HCl);
- ✓ Catalase 30  $\mu$ M.

No ensaio, adicionou-se à cubeta 988  $\mu$ L de tampão Tris-base e 4  $\mu$ L de catalase; zerou-se o espectrofotômetro, adicionou-se 8  $\mu$ L de pirogalol e observou-se a auto-oxidação do mesmo (máximo de oxidação – 100%) durante 2 minutos. Com as amostras, procedeu-se da mesma forma, apenas com o ajuste

do volume de tampão de acordo com a quantidade de amostra adicionada (brânquias 50  $\mu\text{L}$ ), obtendo-se um volume final de 1 mL (MARKLUND, 1985).

Nos homogeneizados de hepatopâncreas, como não foi possível detectar a presença de SOD pelo método de auto-oxidação do pirogalol, utilizou-se o método de detecção adrenalina-adrenocromo. O princípio deste método é o mesmo utilizado no anterior, só muda-se o detector (adrenalina ao invés do pirogalol). A oxidação da adrenalina em um meio contendo glicina-NaOH, forma um produto colorido (o adrenocromo), que é detectado espectrofotometricamente a 480 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do adrenocromo, quanto menor a velocidade de oxidação da adrenalina maior é atividade da enzima. Como no método anterior, os valores desta inibição dados em percentagem, também foram transformados em unidades relativas de SOD utilizando-se uma curva calibração. Utilizou-se os seguintes reagentes:

- ✓ Tampão Glicina 50 mM (pH 10 com NaOH);
- ✓ Bitartarato de adrenalina 60 mM (pH 2 com HCl).

No ensaio, adicionou-se à cubeta 1 ml de tampão glicina; zerou-se o espectrofotômetro, adicionou-se 17  $\mu\text{L}$  de adrenalina e observou-se a oxidação da mesma (máximo de oxidação – 100%) durante 2 minutos. Com as amostras, procedeu-se da mesma forma, apenas com o ajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de amostra adicionada (hepatopâncreas 5  $\mu\text{L}$ ), obtendo-se um volume final de 1 mL (adaptado de BOVERIS *et al.*, 1983).

Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

### 2.5.2. Catalase (CAT)

A atividade da CAT é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, obedecendo a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Deste modo, a atividade da CAT pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. O método consiste em medir a diminuição da absorbância à 240 nm, sendo este o comprimento de onda onde há maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes:

- ✓ Tampão Tris-base 50 mM com EDTA 250  $\mu$ M (pH 8,0 com HCl);
- ✓ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11,44 mM em tampão Tris/EDTA

No ensaio, adicionou-se à cubeta de quartzo 1 ml do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e este medido contra um branco de tampão Tris/EDTA no espectrofotômetro ( $A_{240}$  entre 0,55 e 0,52). Posteriormente, colou-se na cubeta 950  $\mu$ L do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zerou-se o espectrofotômetro, adicionou-se 50  $\mu$ L da amostra (brânquias), e observou-se a diminuição da absorbância durante 2 minutos.

Os resultados foram expressos em U CAT/mg de proteína, onde 1 U é igual a decomposição de 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /min (modificado de RUETHER, 1975).

### 2.5.3. Glutathione S-transferase (GST)

A técnica utilizada para se determinar a atividade da GST, baseia-se sua na capacidade de combinar o 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a GSH



formando 2,4-dinitro-fenil-S-glutationa (DNP-SG). A formação do DNP-SG pode ser observada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm. Para realização do ensaio foram utilizados os seguintes reagentes:

- ✓ Tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5;
- ✓ GSH 20 mM em ácido metafosfórico 5 %;
- ✓ CDNB 20 mM em etanol 95 %.

No ensaio, adicionou-se à cubeta 850  $\mu$ L de tampão fosfato, 50  $\mu$ L de homogeneizado (hepatopâncreas), e 50  $\mu$ L de GSH (concentração final de 1 mM), zerou-se o espectrofotômetro, adicionou-se 50  $\mu$ L de CDNB e observou-se a formação do DNP-SG durante 2 minutos. Para as amostras das brânquias, procedeu-se da mesma maneira, porém utilizou-se um volume 150  $\mu$ L da amostra e 750  $\mu$ L de tampão. Os resultados foram expressos em U GST/mg de proteína, onde 1 U corresponde a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1  $\mu$ mol de DNP-SG/minuto (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981).

## **2.6. WESTERN BLOT E IMUNODETECÇÃO**

Os homogeneizados de hepatopâncreas foram misturados, na proporção de 1:4, em Tampão Laemmli e foram incubados por 5 min. à 100°C; e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15%, seguida de transferência para membrana de nitrocelulose ("Hybond" ECL – Amersham, IL, USA) usando um sistema "Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell".

As membranas com as proteínas foram bloqueadas por 1 hora à 25°C em solução de bloqueio, seguida de incubação por 16 horas a 4°C com o primeiro anticorpo SOD (Anti-SOD<sub>Cu/Zn</sub> sheep polyclonal IgG - Up State) ou GST (Anti-GST rabbit polyclonal IgG - Up State) na diluição 1:1.000 em tampão de lavagem (NET). Após este período, elas foram lavadas com NET (5X de 10 min.) e incubadas por 1 hora a 25°C com o segundo anticorpo para a SOD (rabbit anti-sheep IgG HRP conjugado - Up State) ou para a GST (goat anti-rabbit IgG HRP conjugado - Up State) na diluição de 1:10.000 em NET. A seguir, elas foram novamente lavadas com NET (5X de 10 min.).

As proteínas de interesse foram detectadas por reação de quimiluminescência, utilizando-se um Kit-ECL (Amersham, IL, USA) e expondo as membranas ao filme radiográfico "Hyperfilm" ECL (Amersham, IL, USA) por 1 minuto.

As autoradiografias foram analisadas por meio de densitômetro (VDS, Pharmacia), para determinar a concentração das enzimas antioxidantes SOD<sub>Cu/Zn</sub> e GST. O peso molecular das proteínas estudadas foi verificado através da utilização de um marcador de peso molecular (RPN 800 Full Range Rainbow - Amersham, IL, USA).

#### Reagentes utilizados:

- ✓ Tampão Laemmli (Glicerina 30%, Tris-HCl 0,5 M, SDS 10%, 2-mercaptoetanol, Azul de bromofenol 0,05%; pH 6,8);
- ✓ Gel de poliacrilamida 15%;

- ✓ Tampão de eletroforese (Glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1%; pH 8,3);
- ✓ Tampão de transferência (Glicina 192 mM, Tris 25 mM, Metanol 10%; pH 8,3);
- ✓ Tampão de lavagem – NET (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 50 mM, Triton 0,05%, Gelatina 0,25%; pH 7,4);
- ✓ Solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em NET).

## 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, para cada um dos grupos estudados. Para a análise estatística dos dados, as médias dos grupos foram comparadas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido por um teste de comparação de Student Newman Keuls (SNK); para comparação de dois grupos independentes foi utilizado o teste t de Student, sendo as diferenças consideradas significativas para  $p < 0,05$ . A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa computacional Sigma Stat 2.0 para Windows.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAST, A.; HAENEN, G.R.M. and DOELMAN, C.J.A., 1991. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.* 91:2-13.

BEISIEGEL, U., 1986. Protein blotting. *Eletroforesis.* 7:1-18.

BELLÓ, A.A.; BELLÓ-KLEIN, A.; OLIVEIRA, A.R.; BRUNETTO, A.F.; IRIGOYEN, M.C.; BAUERMAN, L.F.; MIRANDA, M.F.S. and LLESUY, S., 1996. Hydrogen peroxide as a tool for studying oxidative stress in the heart. *Ciência e Cultura, J. Braz. Assoc. Advanc. Science* 48(1/2):29-36.

- BOSCHI, E.E., 1964. Los crustáceos decapodes brachyura del litoral bonaerense. *Bol. Inst. Biol. Mar.*, Mar del Plata 6:1-76.
- BOVERIS, A., 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina* (Buenos Aires) 58:350-356.
- BOVERIS, A. & CADENAS, E., 1982. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Superoxide dismutase. Oberley L.W. (Ed.) CRC Press, Boca Raton, Vol.II:15-30.
- BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I. and KOCH, O.R., 1983. Increased chemi-luminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys* 227(2):534-541.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- BRIDGES, C.R. & BRAND, A.T., 1980. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of some marine Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 65A:399-409.
- BROOKS, S.P.J. & STOREY, K.B., 1997. Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 118(4):1103-1114.
- BUEGE, J.A. & AUST, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52:302-310.
- CHANCE, B.; SIES, H. & BOVERIS, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Reviews* 59: 527-605.
- CORONGIU, F.P. & MILIA, A.A., 1983. An improved method for determining diene conjugation in autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Chem.-Biol. Interact.* 44:289-297.
- CORONGIU, F.P.; BANNI, S. and DESSI, M.A., 1989. Conjugated dienes detected in tissue lipid extracts by second derivative spectrophotometry. *Free Radic. Biol. Med.* 7:183-186.
- DEL MAESTRO, R.F., 1980. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 492: 153-167.
- DRÖGE, W., 2002. The plasma redox state and ageing. *Ageing Research Reviews* 1:257-278.
- EVANS, T.; JIN, H.; ELKINS, N. & SHAPIRO, J. I., 1995. Effect of acidosis on hydrogen peroxide injury to the isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol.* 269: H308-H312.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S. and LISSI, E.A., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potencial (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):261-266.

FENTON, H.J.H., 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65:899-910.

FERREIRA, R.; LLESUY, S.; MILEI, J.; SCORDO, D.; HOURQUEBIE, H.; MOLTENE, L.; De PALMA, C. and BOVERIS, A., 1988. Assesment of myocardial oxidative stress in patientes after myocardial revascularization. *Am. Heart J.* 115:307-312.

FOLCH, J.; LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G.H., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.

FRAGA, C.G.; ONUKI, J.; LUCESOLI, F.; BECHARA, E.J.H. and DI MASCIO, P., 1994. 5-Amino levulinic acid mediates the *in vitro* formation of 8-hydroxi-2-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis.* 15(10):2241-2244.

FRIDOVICH, I., 1976. Oxygens radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In: *Free radicals in biology*. Pryor, W. A. (ed.) Academic Press, N.Y.

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

GÄDE, G., 1984. Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of crayfish *Orconectes limosus*. *Comp. Biochem. Phisiol.* 77:495-501.

GERSHONI, J.M. & PALADE, G.E., 1983. Protein blotting: principles and aplications. *Anal. Biochem.* 131:1-13.

GILLES, R. & PEQUEUX, A., 1986. Physiological and ultraestructural studies of NaCl transport in crustacean gills. *Bolletino di Zoologia.* 53:173-182.

GOLDSTEIN, S. & CZAPSKI, G., 1996. Superoxide Dismutase. In: *Free Radicals: A Pratical Approach*. PUNCHARD, N.A. & KELLY, F.J. (eds) Oxford University Press.

GONÇALVES, A.A., 1993. Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) durante anoxia ambiental. Rio Grande: FURG. Monografia (Curso de Graduação em Oceanografia Biológica).

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S. and BOVERIS, A., 1991. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: and assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Rad. Biol. Med.* 10:93-100.

HABER, F. & WEISS, J., 1934. The catalitic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. Roy. Soc. Ser.A*147:332.

HABIG, W.H.; PABST, M.J. and JAKOBI, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.* 249(22):7130-7139.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.C.M., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3th ed. Oxford University Press Inc., N.Y.

HALLIWELL, B., 1996. Commentary: oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Rad. Res.* 25:57-74.

HALLIWELL, B., 1997. Antioxidants: The Basis – What they are and how to evaluate them. In: *Antioxidants in diseases: Mecanisms and therapy*. SIES, H.(ed), Academic Press, California.

HEARSE, D. J.; GARLICK, P. B. & HUMPHREY, S. M., 1977. Ischemic contracture of the myocardium: mechanisms and prevention. *Am. J. Cardiol.* 39:986-993.

HERMES-LIMA, M. & STOREY, K.B., 1996. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipiens*. *Am. J. Physiol.* 271:R918-R925.

HILL, A.D.; TAYLOR, A.C. and STRANG, R.H.C., 1991. Physiological and metabolic responses of shore crab *Carcinus maenas* (L.) during enviromental anoxia and subsequent recovery. *J. Exp. Mar. Biol. Eco.* 150:31-50.

HOCHACHKA, P.W. & LUTZ, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* B130:435-459.

JONES, D.P., 1985. In: *Oxidative stress*. Academic Press. San Diego.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

LISSI, E.; PASCUAL, C. and DEL CASTILLO, M.D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* 17:299-311.

LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A. and MILEI, S., 1985. Comparision of lipid peroxidation and myocardial damaga induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice. *Tumor.* 71:241-249.

LONGONI B., PRYOR, W.A. and MARCHIAFAVA, P., 1997. Inhibition of lipid peroxidation by N-acetylserotonin and its role in retinal physiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233(3):778-780.

LUCU, C., 1993. Ion transport in the gill epithelium of aquatic Crustacea. *J. Exp. Zool.* 265:378-386.

LUOMA, J.S.; STRALIN, P.; MARKLUND, S.L.; HILTUNEN, T.P.; SARKIOJA, T. and YIA-HERTTUALA, S., 1998. Expression of extracellular SOD and iNOS im macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:157-167.

- LUSHCHAK, V.I.; LUSHCHAK, L.P.; MOTA, A.A. and HERMES-LIMA, M., 2001. Oxidative stress and oxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280:R100-R107.
- LUTZ, P.L. & STOREY, K.B., 1997. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: *Handbook of Physiology – Comparative Physiology*. Dantzler, W.H. (ed.), Oxford: American Physiological Society, vol. II.
- MÄNE-GARZON, F.; DEI-CAS, E.; SPECTOR, B.H. and LEYMONTE, J., 1974. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). I. Osmorregulation frente a cambios de la salinidad. *Physis*. Sección A, 33(86):163-171.
- MANNERVIK, B. & GLUTHENBERG, C., 1981. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology*. 77:231-235.
- MARKLUND, S., 1985. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton. CRC Press.
- MARKS, D.B.; MARKS, A.D. and SMITH, C.M., 1996. *Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins (eds), Baltimore, Maryland – USA.
- McCORD, J.M., 1985. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *New Engl. J. Med.* 312:159-163.
- McCORD, J.M., 1987. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Federation Proc.* 46:2402-2406.
- MENEGHINI, R., 1987. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* 5:57-62.
- NELSON, D.L. & COX, M.M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3th ed. Worth Publishers, N.Y.
- NEWSHOLME, E.A. & LEECH, A.R., 1984. *Biochemistry for the Medical Sciences*. John Wiley & Sons (eds), New York.
- ODUM, E.P., 1985. *Ecologia*. Interamericana (ed), Rio de Janeiro.
- OLIVEIRA, G.T.; ROSSI, I.C. and DA SILVA, R.S.M., 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Marine Biology*. 139:335-342.
- PANNUNZIO, T.M. & STOREY, K.B., 1998. Antioxidant defenses and peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221:277-292.
- RUETHER, 1975. *Red cell metabolism*. Greene & Stratton (eds.) 2ed. N.Y.

- SANTOS, E.A.; BALDISSEROTO, B.; BIANCHINI, A.; COLARES, E.P.; NERY, L.E.M. and MANZONI, G.C., 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 88A(1):21-25.
- SCHMIDT-NIELSEN, K., 1996. Fisiologia Animal – Adaptação e meio ambiente. 5ed. Livraria Santos (ed.), São Paulo.
- SIEBERS, D.; LEWECK, K.; MARKUS, H. and WINKLER, A., 1982. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Marine Biology.* 36:37-43.
- SIES, H. & MURPHY, M.E., 1991. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 8:211-224.
- SIES, H., 1997. Antioxidants in Diseases: Mechanisms and Therapy. In: *Advances in Pharmacology.* California, Academic Press.
- SOUTHORN, P.A. & POWIS, G., 1988. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.* 63:381-389.
- STARR, C. & TAGGART, R., 1998. Principles of evolution. In: *BIOLOGY: the unity and diversity of life.* 8th ed. Wadsworth Publishing Company Inc., California.
- STOREY, K.B., 1996a. Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances. *Comp. Biochem. Physiol.* 113:23-35.
- STOREY, K.B., 1996b. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1715:1733.
- STOREY, K.B. & STOREY, J.M., 1990. Facultative metabolic rate depression: molecular regulation and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quart. Rev. Biol.* 65:145-174.
- STRYER, L., 1996. *Bioquímica.* 4ed. Guanabara Koogan (ed.), Rio de Janeiro.
- TAYLOR, A.C. & SPICER, J.I., 1987. Metabolic responses of prawns *Palaemon elegans* (Rathke) and *P. serratus* (Pennant) (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. *Mar. Biol. Berlin.* 95:521-530.
- TEAL, J.M. & CAREY, F.G., 1967. The metabolism of marsh crabs under conditions of reduced oxygen pressure. *Physiol. Zool.* 40:83-91.
- THOMPSON, R.K. & PRITCHARD, A.W., 1969. Respiratory adaptations of two burrowing crustaceans, *Callinassa californiensis* and *Upogebia pugettensis*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole,* 136:274-287.
- TURCATO, G. S., , 1990 Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase em Zoologia).



URICH, K., 1994. Comparative Animal Biochemistry. Springer Verlag (ed.), New York: Academic Press.

WHEATLEY, R.A., 2000. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trac-Trens Anal. Anal. Chem.* 19(10):617-628.

WILLMORE, W.G. & STOREY, K.B., 1997. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Mol. Cell. Biochem.* 170:177-185.

WILSON, K. & WALKER, J.M., 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. 4th ed. Cambridge University Press, New York.

WINSTON, G.W. & DI GIULIO, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.* 19:137-161.

YU, P.B., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.* 74(1):139-162.

## ***TRABALHO 1***

---

**Efeitos da anoxia ambiental e da fase de recuperação sobre o balanço oxidativo nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata***

Autores: Ubirajara O. de Oliveira & Luiz Carlos Rios Kucharski

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Departamento de Fisiologia/Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/UFRGS

**Título de página:** Balanço oxidativo nas brânquias do *C. granulata*.

Ubirajara O. de Oliveira

R. Sarmiento Leite, 500 – Campos Centro

Porto Alegre-RS/Brasil

Fone: (51) 3316-3505

Fax: (51) 3316-3166

e-mail: biraoliveira@yahoo.com

## **Resumo**

Neste estudo, foram analisados os efeitos da anoxia ambiental (8 h) e de diferentes períodos de reoxigenação (20 e 40 min.) sobre o balanço oxidativo nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata*. A exposição à anoxia causou no tecido branquial um aumento na atividade das enzimas CAT e GST, e uma diminuição na atividade da SOD. As enzimas estudadas tendem a retornar aos níveis de controle durante a recuperação. A atividade destas enzimas parecem responder diretamente às variações na concentração do oxigênio ambiental. As BP apresentaram uma maior atividade das enzimas antioxidantes do que as BA. Nos tecidos analisados, as defesas antioxidantes não-enzimáticas (TRAP) não apresentaram nenhuma alteração a exposição a anoxia. Contudo, durante a recuperação observou-se um aumento no TRAP em ambos os tecidos. A exposição a anoxia não causou nenhuma alteração na lipoperoxidação (DC e TBA-RS), nos tecidos analisados. Entretanto, durante a recuperação observou-se uma diminuição nos níveis de DC, seguido de um aumento nos níveis de TBA-RS. Os resultados deste estudo, demonstram que o *C. granulata*, assim como, outras espécies intertidais apresenta adaptações em seus sistemas de defesa antioxidantes, que o capacitam a ocupar e a manter-se em ambientes com extremas variações das características físico-químicas, como os estuários.

## **Palavras-chave**

Anoxia, Crustáceos, Enzimas antioxidantes, EAO, Lipoperoxidação, Reoxigenação.

## 1. Introdução

Invertebrados marinhos intertidais de respiração branquial freqüentemente experimentam períodos cíclicos de privação de O<sub>2</sub> com as marés, mas têm excelente capacidade para anaerobiose facultativa, o que possibilita a eles sobreviverem por dias ou semanas sem oxigênio (BROOKS & STOREY, 1997).

Entre os vertebrados, que apresentam essa habilidade temos duas espécies de peixes ciprinídeos, a carpa cruciana (*Carassius carassius*) e o peixe-dourado (*Carassius auratus*), e a duas espécies de tartarugas de água-doce (*Chrysemys picta* e *Trachemys scripta elegans*), que tornaram-se modelos de vertebrados no estudo da resistência à anoxia (STOREY, 1996a; WILLMORE & STOREY, 1997, LUSHCHAK *et al.*, 2001).

Adicionalmente, outros animais resistem a períodos cíclicos de normoxia e hipóxia; como os gastrópodes terrestres, que durante os períodos de estiva retraem-se em suas conchas, fechando-as com o epifragma (envoltório mucoso), evitando assim a perda excessiva de água; e os animais mergulhadores, que experimentam profunda hipóxia em muitos de seus órgãos, causada por ajustes circulatórios que redirecionam o sangue oxigenado aos músculos esqueléticos e ao cérebro (STOREY & STOREY, 1990; HERMES-LIMA & STOREY, 1995; STOREY, 1996a).

Ao enfrentarem essas situações de estresse ambiental, os organismos adotam uma estratégia em comum, para maximizar o tempo de sobrevivência, que é a depressão metabólica. Eles são capazes de diminuir seus níveis metabólicos para valores entre 10 e 30% de seu estado metabólico de repouso (LUTZ & STOREY, 1997; HOCHACHKA & LUTZ, 2001).

Entretanto, todas estas situações de reduzida disponibilidade e/ou consumo de oxigênio, fazem com que a transição de volta para o estado metabólico normal, seja acompanhada por um rápido e grande aumento na captação, concentração e consumo de O<sub>2</sub> pelos organismos. Essa transição é um análogo funcional à situação de reperfusão que ocorre após o insulto isquêmico em mamíferos (WINSTON & DI GIULIO, 1991; STOREY, 1996b).

A reintrodução do oxigênio causa um aumento na produção das espécies ativas de oxigênio (EAO), assim como, o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>). Essas EAO causam inúmeros efeitos deletérios as células, como oxidação de lipídeos, proteínas e DNA; que provocam alterações no funcionamento normal de células e tecidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Portanto, os animais que naturalmente enfrentam situações de ampla variação na disponibilidade de O<sub>2</sub> necessitam de estratégias que os permitam lidar com as conseqüências da reintrodução do O<sub>2</sub>, em seus sistemas (PANNUNZIO & STOREY, 1998).

Adicionalmente, o estudo das estratégias utilizadas pelos organismos expostos à constantes variações na disponibilidade de O<sub>2</sub> podem trazer relevantes informações para a saúde humana (WINSTON & DI GIULIO, 1991). Nos últimos anos, essas estratégias vem sendo estudas em moluscos, peixes, anfíbios e répteis (STOREY & STOREY, 1990; HERMES-LIMA & STOREY, 1996; LUTZ & STOREY, 1997; WILLMORE & STOREY, 1997; PANNUNZIO & STOREY, 1998; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; LUSHCHAK *et al.*, 2001). Contudo, pouquíssimos estudos têm investigado as estratégias adotadas pelos crustáceos.

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* em seu habitat (estuários), é submetido freqüentemente a um elevado estresse ambiental, tolerando amplas variações das características físicas e químicas do ambiente (ODUM, 1985); estando sujeito rotineiramente a eventos fisiológicos de isquemia/reperfusão. Tornando-se relevante analisar quais são as estratégias utilizadas pelo mesmo, ao enfrentar essas situações de estresse oxidativo.

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito da anoxia ambiental e de diferentes períodos de reoxigenação sobre o balanço oxidativo nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata*.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Coleta e Manutenção dos Animais*

Foram utilizados, caranguejos machos adultos da espécie *Chasmagnathus granulata* no estágio de intermuda, coletados de um estuário às margens da Lagoa de Tramandaí-RS/Brasil. Os caranguejos foram capturados manualmente e transportados em caixas plásticas com água do próprio local. Os animais foram coletados de acordo com a legislação ambiental brasileira (Portaria 332/90 IBAMA).

Posteriormente, foram selecionados animais com carapaças entre 2,5 e 3 cm de diâmetro (para minimizar os efeitos da idade e do tamanho dos mesmos); que foram transferidos para aquários com oxigenação constante, salinidade de 20‰, temperatura média 25°C, fotoperíodo de 12/12 horas claro/escuro e alimentados com carne bovina *ad libitum*, durante 15 dias.

## *2.2. Procedimentos Experimentais*

Após os 15 dias de aclimação, um grupo de animais foi utilizado como controle (CT). Outro grupo de animais (grupo anoxia - AX) foi colocado em aquário (previamente aerado com gás nitrogênio - N<sub>2</sub> durante 20 minutos), onde permaneceu por 20 minutos ainda sob constante aeração de N<sub>2</sub> (totalizando 40 minutos de aeração com N<sub>2</sub>). Após este período, o aquário foi hermeticamente fechado com filme de PVC, e a partir desse momento os animais permaneceram 8 horas em anoxia ambiental. A fase de recuperação (RC), foi realizada colocando-se novamente parte dos caranguejos, em aquário com oxigenação constante, onde permaneceram durante 20 e 40 minutos. Ao final de cada período experimental, um “pool” de 5 a 7 animais foram imediatamente crioanestesiados e as brânquias retiradas para as determinações bioquímicas. As brânquias foram divididas em anteriores (BA) e posteriores (BP) pois exercem funções distintas: as brânquias anteriores estão envolvidas na respiração e as posteriores na osmorregulação (SIEBERS *et al.*, 1982; GILLES & PEQUEUX, 1986; LUCU, 1993).

## **2.3. Preparo dos Homogeneizados**

### *2.3.1. Homogeneizados para TBA-RS , TRAP e SOD*

As brânquias foram rapidamente retiradas, pesadas e homogeneizadas por 40 segundos em um homogeneizador Ultra-Turrax, com KCl 1,15% (7 mL/g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 µL/mL de KCl adicionado). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 8.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24, Du Pont Instruments, EUA), o sobrenadante foi



retirado e congelado em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  para as dosagens posteriores (modificado de LLESUY *et al.*, 1985).

### *2.3.2. Homogeneizados para CAT e GST*

Parte das brânquias foram homogeneizadas, com Tris-HCl 20 mM e Sacarose 0,5 M (7 mL/g de tecido), mais PMSF 100 mM em isopropanol (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de tampão adicionado). Os procedimentos experimentais foram os mesmos supra citados.

## **2.4. Determinação das Proteínas**

As proteínas foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976), usando albumina bovina (1 mg/mL) como padrão.

## **2.5. Enzimas Antioxidantes**

### *2.5.1. Superóxido Dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi determinada pelo método descrito por MARKLUND (1985), segundo o nível de inibição da auto-oxidação do pirogalol. Alíquotas dos homogeneizados (50  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas a um Tampão Tris/EDTA 50 mM (pH 8,2) contendo 120 nM de catalase e 190 mM de pirogalol, num volume final de 1 mL. As variações na absorbância a 420 nm foram observadas, durante um intervalo de 2 min. A atividade da enzima foi determinada a partir de uma curva padrão de SOD, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

### **2.5.2. Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada num meio de reação contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  11,44 mM em tampão Tris/EDTA 50 mM (pH 8,0). As alterações na absorbância com a adição dos homogeneizados (50  $\mu\text{L}$ ) foram monitoradas a 240 nm por 2 min. Os resultados foram expressos em U CAT/mg de proteína, onde 1 U é igual a decomposição de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  /min (modificado de RUETHER, 1975).

### **2.5.3. Glutathione S-Transferase (GST)**

A atividade da GST foi determinada num meio de reação contendo: tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), GSH 1 mM, CDNB 1 mM e 150  $\mu\text{L}$  de homogeneizado. A formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutathione (DNP-SG) foi monitorada a 340 nm por 2 min. Os resultados foram expressos em U GST/mg de proteína, onde 1 U corresponde a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de DNP-SG por minuto (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981).

## **2.6. Capacidade Antioxidante Total (TRAP)**

A determinação da TRAP baseou-se na decomposição do 2,2' Azo-bis (2-amidinopropano) dihidroclorato (0,5% em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4), utilizando-se o luminol (1 mg/mL em NaOH 0,1 N), como fonte de quimiluminescência. O tempo de indução ( $T_i$ ), foi utilizado para avaliar a quantidade relativa de antioxidantes presentes na amostra; utilizando-se o Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão. As medidas foram realizadas em um contador de radioatividade beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência

desconectado e utilizando o canal de trítio. Os resultados foram expressos em mM de Trolox /  $\mu$ l de amostra (LISSI *et al.*, 1992; EVELSON *et al.*, 2001).

## **2.7. Lipoperoxidação**

### **2.7.1. Dienos Conjugados (DC)**

A determinação dos dienos conjugados vem sendo amplamente utilizada como um índice dos primeiros eventos da lipoperoxidação. As brânquias foram homogeneizadas 1:15 (P/V) em cloroformio/metanol 2:1 (V/V), e centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm. A fase líquida foi misturada em ácido sulfúrico/H<sub>2</sub>O 1:2.000 (V/V) em igual volume e novamente centrifugadas. A fase superior foi aspirada, e a fase inferior aerada com N<sub>2</sub> para a obtenção dos lipídios, que foram pesados e redissolvidos em hexano, obtendo uma concentração final de 2 mg/mL. O conteúdo de dienos conjugados nos lipídeos foi determinado pela segunda derivada espectrofotométrica (diferença entre os picos de absorvância a 240 e 233 nm, que representam respectivamente, os *cis-trans* e *trans-trans* estereoisômeros de dienos conjugados). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de absorvância d<sup>2</sup>A/mg de lipídeos (FOLCH *et al.*, 1957; CORONGIU & MILIA, 1983; CORONGIU *et al.*, 1989).

### **2.7.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)**

A concentração de malondialdeído e outros aldeídos, produtos característicos do estágio terminal da lipoperoxidação, foram determinados pelo método de BUEGE & AUST (1978). Adicionou-se 0,25 mL de homogeneizado em 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (P/V), centrifugou-se à 3.000 rpm

por 5 minutos. Retirou-se 0,5 mL do sobrenadante, que foi misturado a 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), esta mistura foi aquecida por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada no gelo. Após, realizou-se a leitura da absorbância à 535 nm, em espectrofotômetro marca Varian modelo Cary. Os resultados são expressos em nmoles de TBA-RS/mg de proteína, usando um coeficiente de extinção de 156 mM<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

## **2.8. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK), ou teste t de Student para amostras independentes. Utilizou-se o programa Sigma Stat 2.0 para Windows, sendo as diferenças consideradas significativas para p<0,05.

## **3. Resultados**

### **3.1. Defesas Antioxidantes Enzimáticas**

A atividade de três enzimas envolvidas na defesa antioxidante das brânquias anteriores (BA) e posteriores (BP) do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia (8 h) e de recuperação aeróbia (20 e 40 min.) após a anoxia, estão representadas na tabela 1. A exposição à anoxia causou uma diminuição significativa na atividade da SOD (37% e 16% em relação aos valores de controle nas BA e BP, respectivamente). Após 20 min. de recuperação, tanto nas BA quanto nas BP, a atividade da SOD retornou aos valores de controle. Contudo, após 40 min. de recuperação houve, novamente, uma redução significativa na atividade da SOD (45% e 25% em relação aos valores de controle nas BA e BP, respectivamente).

A exposição à anoxia causou, diferentemente da SOD, um aumento significativo na atividade da CAT (312% e 186% em relação aos valores de controle nas BA e BP, respectivamente). Após 20 min. de recuperação, observou-se uma redução significativa na atividade da CAT em relação à anoxia, tanto nas BA quanto nas BP; mas sua atividade ainda permaneceu aumentada em relação aos controles (148% e 130% nas BA e BP, respectivamente). Após 40 min. de recuperação houve uma nova redução na atividade da CAT; sendo que, nas BA ainda encontrou-se aumentada em relação ao controle (132%), enquanto nas BP retornou aos valores de controle.

A atividade da GST, assim como a CAT, apresentou um aumento significativo durante o período de anoxia (332% e 231% em relação aos valores de controle nas BA e BP, respectivamente). Após 20 min. de recuperação, houve uma redução significativa na atividade da GST em relação a anoxia, tanto nas BA quanto nas BP; mas a atividade nas BA ainda encontrou-se aumentada em relação ao controle (247%), enquanto nas BP retornou aos valores de controle. Entre os períodos de recuperação (20 e 40 min.) não se observou nenhuma modificação na atividade da GST.

Comparando-se as BA e BP controles, verificou-se que a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST), foram significativamente maiores nas BP; sendo 17%, 204% e 398% maiores em relação as BA, para SOD, CAT e GST, respectivamente.

### *3.2. Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas*

A figura 1 mostra a determinação da capacidade antioxidante total (TRAP), que representa as defesas antioxidantes não-enzimáticas hidrossolúveis,

nas BA e BP do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia (8 h) e de recuperação aeróbia (20 e 40 min.) após a anoxia. A exposição à anoxia não causou nenhuma alteração significativa nas defesas antioxidantes não-enzimáticas, apesar de apresentarem uma tendência à diminuição em relação aos respectivos controles, tanto nas BA quanto nas BP. Após 20min. de recuperação, as BP apresentaram um aumento significativo nas defesas antioxidantes não-enzimáticas em relação ao período de anoxia (270%); enquanto as BA permaneceram sem apresentar nenhuma alteração significativa. Contudo, aos 40 min. de recuperação enquanto as defesas antioxidantes não-enzimáticas retornaram aos valores do controle nas BP, nas BA percebeu-se um aumento significativo em relação ao período de anoxia (95%). Comparando-se as BA e BP controles, verificou-se que não há diferença significativa na capacidade antioxidante total, apesar das BA apresentarem uma capacidade 67% maior.

### 3.3. Produtos da Lipoperoxidação

A figura 2 mostra os efeitos da exposição a anoxia (8 h) e da recuperação aeróbia (20 e 40 min.) após a anoxia, sobre o conteúdo dos dienos conjugados (DC) (eventos iniciais da lipoperoxidação) determinados nos lipídeos das BA e BP do caranguejo *C. granulata*. A exposição à anoxia não causou nenhuma alteração significativa no conteúdo dos DC nos tecidos analisados. Após 20min. de recuperação, houve uma redução significativa no conteúdo dos DC (36% e 29% em relação aos valores de controle nas BA e BP, respectivamente). Após 40 min. de recuperação, o conteúdo dos DC encontrou-se ainda mais reduzido, sendo esta redução de 47% e 48% em relação aos valores de controle nas BA e BP, respectivamente. Comparando-se as BA e BP controles, verificou-se que o conteúdo dos DC é significativamente maior nas BP (122%).

A concentração de malondialdeído e outros aldeídos (produtos do estágio terminal da lipoperoxidação) foram determinados pela reação com o ácido tiobarbitúrico (figura 3). Os níveis de TBA-RS não apresentaram nenhuma alteração significativa a exposição à anoxia, assim como, à recuperação de 20 min., tanto nas BA quanto nas BP; apesar de apresentarem uma leve tendência ao aumento. Contudo, após 40 min. de recuperação, tanto as BA quanto as BP apresentaram um aumento significativo nos níveis de TBA-RS; sendo 187% e 161% maiores que os valores dos correspondentes controle nas BA e BP, respectivamente. Comparando-se as BA e BP controles, verificou-se que não há diferença significativa nos níveis de TBA-RS.

#### **4. Discussão**

Caranguejos *Chasmagnathus granulata* submetidos à períodos de anoxia ambiental apresentam um aumento nos níveis de glicose e de L-lactato na hemolinfa (GONÇALVES, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2001), e uma diminuição na atividade locomotora e na frequência cardíaca (GONÇALVES, 1993). Em caranguejos *Carcinus maenas* além destas adaptações, também foi observada uma diminuição em torno de 80% na produção de calor (HILL *et al.*, 1991). Todas estas alterações remontam a um estado de depressão metabólica (LUTZ & STOREY, 1997).

Entretanto, durante a fase de recuperação em condições de normoxia, os crustáceos demonstram um aumento do consumo de O<sub>2</sub> que é proporcional ao grau e ao tempo de exposição a anoxia/hipoxia (TEAL & CAREY, 1967; THOMPSON & PRITCHARD, 1969; BRIDGES & BRAND, 1980; TAYLOR & SPICER, 1987; HILL *et al.*, 1991; GONÇALVES, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Estudos sobre os efeitos da anoxia e da recuperação aeróbia vêm sendo realizados em diferentes espécies (ver revisões: WINSTON & DI GIULIO, 1991; STOREY, 1996b; LUTZ & STOREY, 1997; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002). Contudo, sabe-se muito pouco sobre as estratégias adotadas pelos crustáceos, frente a estes eventos análogos ao processo de isquemia-reperusão.

Os resultados obtidos no presente estudo, mostram que o perfil das respostas frente ao processo de anoxia-reoxigenação nas BA e BP do caranguejo *C. granulata*, é muito semelhante. Apesar de, as BA apresentarem alterações evidentes em relação as BP; provavelmente por estarem mais expostas funcionalmente às variações na concentração de O<sub>2</sub>, por serem o principal local de trocas gasosas (SIEBERS *et al.*, 1982; LUCU, 1993).

Como visto na tabela 1, os *C. granulata* expostos à anoxia de 8 h, apresentaram no tecido branquial um aumento significativo na atividade das enzimas CAT e GST; similarmente, o peixe-dourado *Carassius auratus* (LUSHCHAK *et al.*, 2001) e a rã leopardo *Rana pipiens* (HERMES-LIMA & STOREY, 1996) expostos à períodos de anoxia, também apresentaram um aumento na atividade de enzimas antioxidantes específicas. Diferentemente, destes estudos, nos quais houve a manutenção da atividade de outras enzimas antioxidantes, no *C. granulata* observou-se um diminuição na atividade da SOD (tabela 1). Por outro lado, o gastropode marinho *Littorina littorea* (PANNUNZIO & STOREY, 1998) e a tartaruga de água-doce *Trachemys scripta elegans* (WILLMORE & STOREY, 1997) expostos a períodos de anoxia, também, demonstraram uma diminuição significativa na atividade SOD e de outras enzimas antioxidantes. O aumento na atividade da CAT e da GST durante a anoxia, pode



ser uma estratégia de “preparação para o estresse oxidativo”, com o objetivo de proteger os tecidos contra um possível dano durante o período de reoxigenação (HERMES-LIMA & STOREY, 1996; HERMES-LIMA *et al.*, 1998). A atividade destas enzimas, assim como, a da SOD parecem responder as variações na concentração do oxigênio ambiental. A anoxia provoca uma supressão na produção do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que pode inibir a atividade da SOD, pela menor oferta de substrato e, ao mesmo tempo pode estimular a atividade da CAT e da GST, por diminuir sua inibição sobre elas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Como, nos trabalhos supra citados, as enzimas estudadas tendem a retornar aos níveis de controle durante a recuperação. A redução na atividade da CAT e da GST, assim como, o aumento na atividade da SOD em relação ao período de anoxia, observados aos 20 min. de recuperação, provavelmente se devam ao aumento na produção do radical superóxido, causado pela reintrodução do oxigênio. Já a redução na atividade da SOD observada aos 40 min. de recuperação, pode ser decorrente de um acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), causado possivelmente por uma limitada capacidade da CAT e outras enzimas (ex.: GPx) em detoxificar a grande quantidade de  $H_2O_2$  produzido durante a reoxigenação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O fato de aos 40 min. de recuperação, as BA ainda apresentarem uma maior atividade da CAT e da GST em relação a seus controles, pode ser resultado de uma maior oferta de substrato ( $H_2O_2$  e ROOH, respectivamente) devido ao seu papel fisiológico. O mesmo não se observou nas BP por elas estarem menos expostas funcionalmente às variações na concentração de  $O_2$  (LUCU, 1993) e/ou por apresentarem naturalmente uma maior atividade das enzimas antioxidantes (tabela 1). A maior atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST) nas

BP, pode dever-se a sua alta atividade metabólica, uma vez que este tecido apresenta um grande número de ATPases e de transportadores iônicos (GILLES & PÉQUEUX, 1986; LUCU, 1993).

As defesas antioxidantes não-enzimáticas hidrosolúveis (TRAP) não apresentaram nenhuma alteração significativa a exposição à anoxia (figura 1), por outro lado foi observado um aumento no TRAP, tanto nas BA quanto nas BP, durante os períodos de recuperação. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados em várias espécies aquáticas (ver revisão: WINSTON & DI GIULIO, 1991), que demonstraram um aumento nos antioxidantes de baixo peso molecular frente a situações de estresse oxidativo. Esta resposta, pode ser uma tentativa para limitar o dano oxidativo durante a reoxigenação, pois os antioxidantes não-enzimáticos atuam como *scavengers/quenchers* de EAO e/ou podem quelar ions metálicos diminuindo sua capacidade de gerar EAO (SIES, 1991; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999); ou ainda uma tentativa para detoxificar os produtos do metabolismo anaeróbico, acumulados durante o período de anoxia (PANNUNZIO & STOREY, 1998). O fato do aumento no TRAP nas BP (20 min. de recuperação) preceder ao aumento ocorrido nas BA (40 min. de recuperação), sugere haver um direcionamento dos antioxidantes não-enzimático para os tecidos, priorizando os mais importantes para a sobrevivência do animal; onde a osmorregulação (BP) teria prioridade sob a respiração (BA).

A avaliação dos produtos da lipoperoxidação (figuras 2 e 3), mostraram que a exposição a anoxia não causou nenhuma alteração nos níveis de DC e de malondialdeído, nos tecidos analisados. O que parece refletir uma redução na disponibilidade das EAO, para reagirem com os componentes biológicos. Já, nos períodos de recuperação observou-se uma diminuição nos níveis de DC, seguido

de um aumento nos níveis de malondialdeído. Tais resultados, sugerem que as alterações nos mecanismos de defesa antioxidantes, ocorridas durante o período de anoxia, são eficientes para impedir/reparar o início da peroxidação lipídica (DC) quando os tecidos são reoxigenados e/ou apresentam uma grande capacidade de remoção de lipoperóxidos (ex.: via GPx); mas são menos eficazes para impedir a propagação da lipoperoxidação (não analisada) e/ou são menos eficazes na remoção dos seus produtos finais (TBA-RS). Ou ainda, o aumento no TBA-RS pode refletir um acúmulo de outros aldeídos, não provenientes da peroxidação lipídica (PANNUNZIO & STOREY, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O maior nível de DC nas BP, como antes mencionado, pode dever-se a sua alta atividade metabólica.

Os resultados apresentados neste estudo, sugerem que as brânquias sejam um sítio importantíssimo de defesa antioxidante, reforçando seu papel fisiológico (respiração e osmorregulação) fundamental para a sobrevivência do animal. E demonstram que o *C. granulata*, assim como, outras espécies intertidais que estão expostas a ciclos naturais de anoxia/hipoxia e reoxigenação, apresenta adaptações em seus sistemas de defesa antioxidantes, que o capacitam a ocupar e a manter-se em ambientes com extremas variações das características físico-químicas, como os estuários. E estas constantes situações de estresse oxidativo podem levar à relativa proteção antioxidante apresentada nos caranguejos *C. granulata*.

### **Agradecimentos**

Gostaríamos de agradecer à Profa. Dra. Roselis S. M. da Silva, à Profa. Dra. Adriane Belló Klein e ao Prof. Dr. Paulo Ivo H. B. Júnior pelo auxílio incondicional;

aos colegas do Lab. de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, a CAPES e a FAPERGS pelo auxílio financeiro.

## Tabelas

**Tabela 1.** Efeitos da exposição a anoxia e da recuperação aeróbia sobre a atividade das enzimas antioxidantes em brânquias anteriores e posteriores do caranguejo *C. granulata*

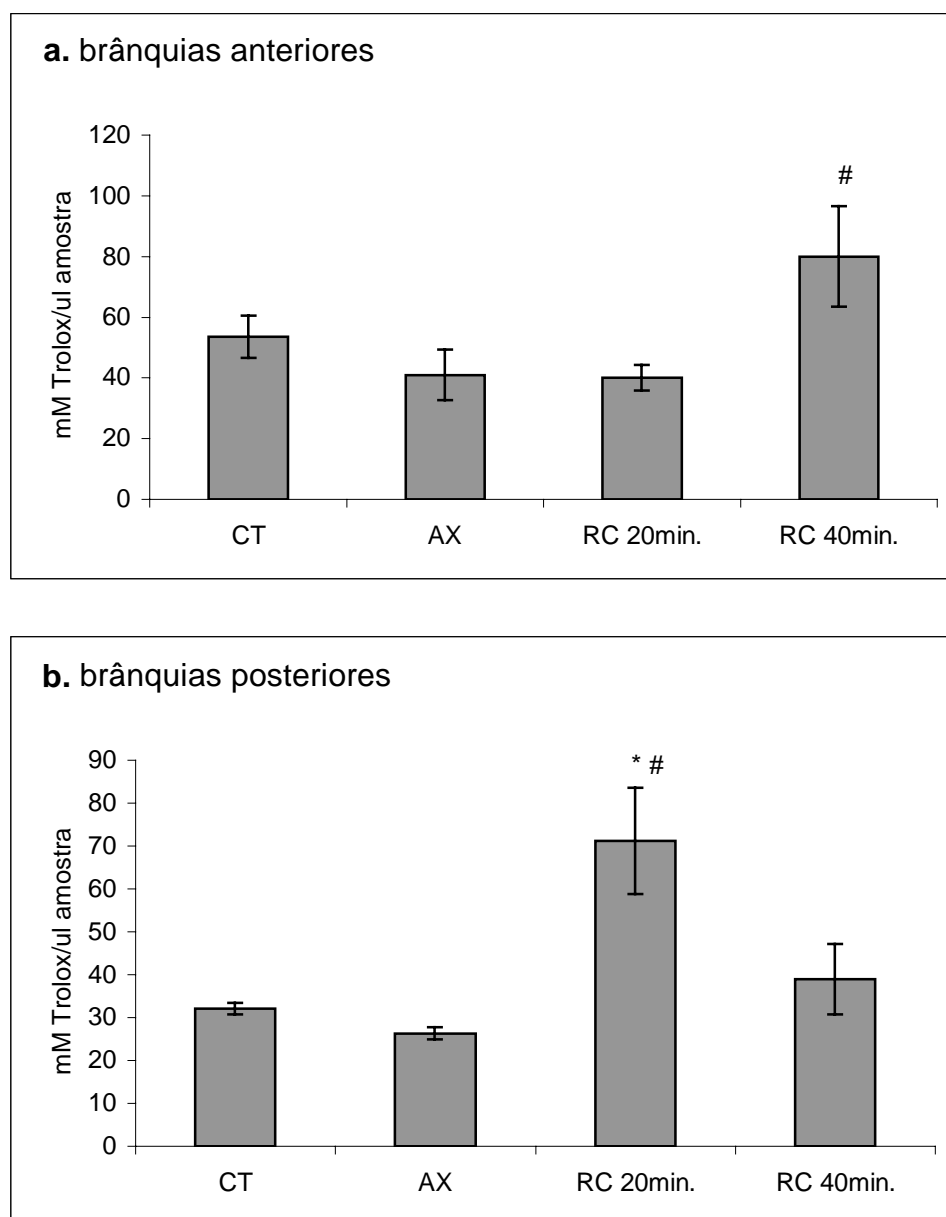
	<b>SOD (mU/mg)</b>	<b>CAT (U/mg)</b>	<b>GST (mU/mg)</b>
<b>Brânquias anteriores</b>			
Controle	378±18	1,09±0,11	1,72±0,49
Anoxia - 8 h	238±34 <sup>a</sup>	3,40±0,18 <sup>a</sup>	5,71±0,21 <sup>a</sup>
Recuperação 20 min.	338±16 <sup>b</sup>	1,61±0,11 <sup>a,b</sup>	4,25±0,71 <sup>a,b</sup>
Recuperação 40 min.	208±32 <sup>a</sup>	1,44±0,10 <sup>a,b</sup>	4,31±0,49 <sup>a,b</sup>
<b>Brânquias posteriores</b>			
Controle	441±13 <sup>c</sup>	2,22±0,06 <sup>c</sup>	6,84±1,02 <sup>c</sup>
Anoxia - 8 h	372±34 <sup>a</sup>	4,13±0,14 <sup>a</sup>	15,81±0,73 <sup>a</sup>
Recuperação 20 min.	441±17 <sup>b</sup>	2,89±0,12 <sup>a,b</sup>	10,03±2,88 <sup>b</sup>
Recuperação 40 min.	330±35 <sup>a</sup>	2,27±0,11 <sup>b</sup>	10,39±3,31 <sup>b</sup>

As atividades estão expressas por mg de proteína, média±desvio padrão,  $n=3-4$  (pool 5-7 animais).

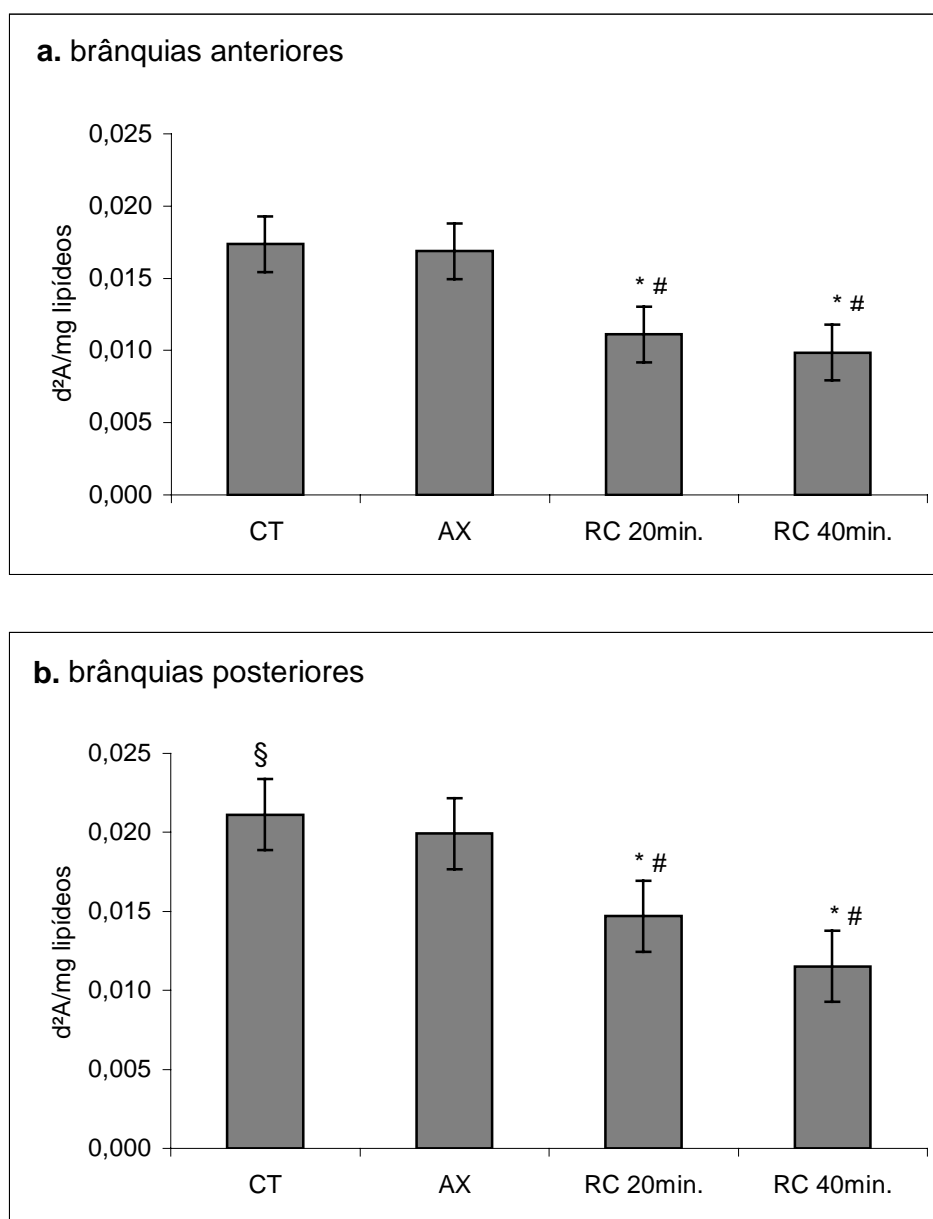
<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle correspondente,  $p<0,05$ .

<sup>b</sup> Significativamente diferente do período de anoxia,  $p<0,05$ .

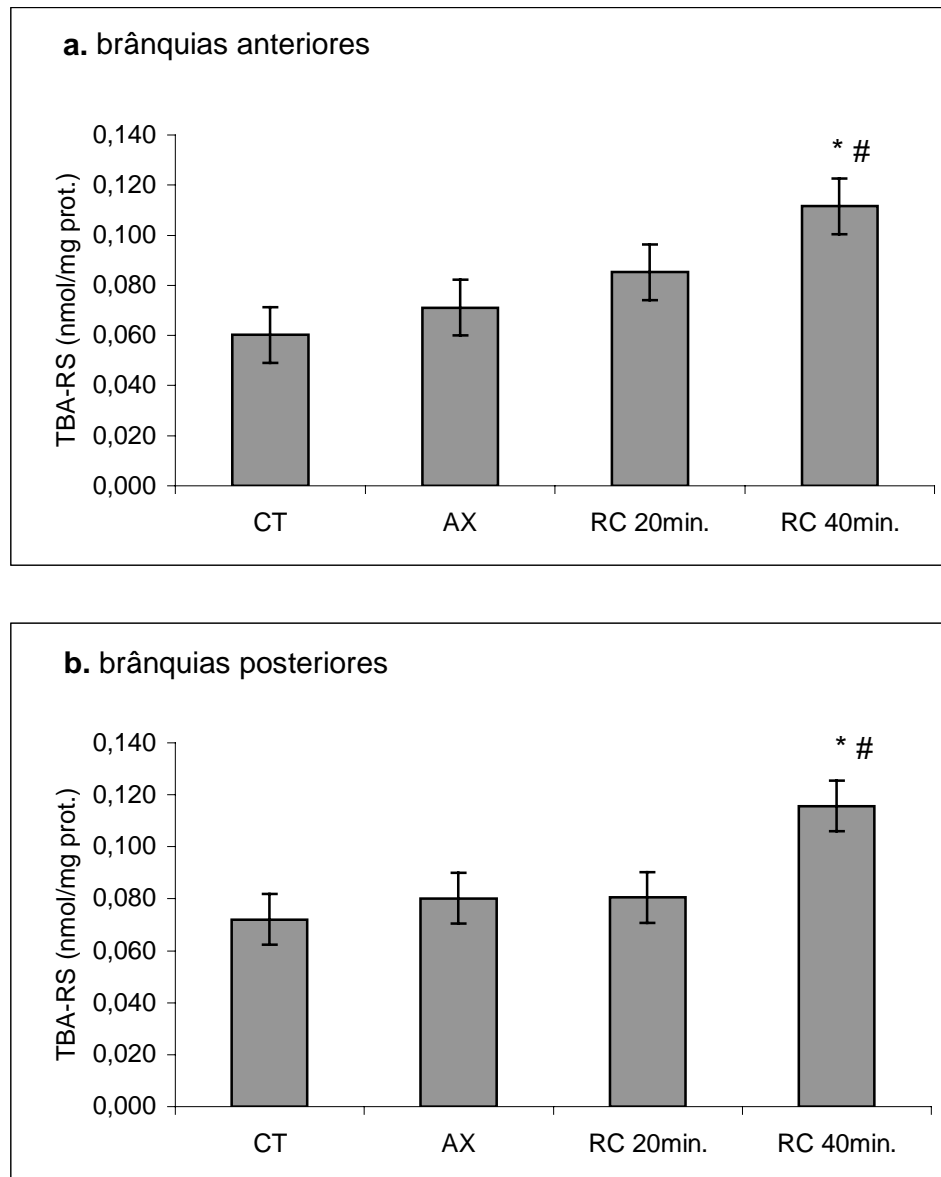
<sup>c</sup> Significativamente diferente do controle das brânquias anteriores,  $p<0,05$ .

**Figuras**

**Figura 1.** Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) nas brânquias do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia - 8 h (AX) e de recuperação aeróbia (RC 20min. e RC 40min.) após a anoxia. **a.** brânquias anteriores. **b.** brânquias posteriores. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n=2$  (pool 5-7 animais). \* diferença significativa em relação ao controle (CT),  $p<0,05$ ; # diferença significativa em relação ao período de anoxia,  $p<0,05$ .



**Figura 2.** Determinação do conteúdo de dienos conjugados (DC) nas brânquias do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia - 8 h (AX) e de recuperação aeróbia (RC 20min. e RC 40min.) após a anoxia. **a.** brânquias anteriores. **b.** brânquias posteriores. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n=4-5$  (pool 5-7 animais). \* diferença significativa em relação ao controle (CT),  $p<0,05$ ; # diferença significativa em relação ao período de anoxia,  $p<0,05$ ; § diferença significativa em relação as brânquias anteriores,  $p<0,05$ .



**Figura 3.** Determinação do conteúdo das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) nas brânquias do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia - 8 h (AX) e de recuperação aeróbia (RC 20min. e RC 40min.) após a anoxia. **a.** brânquias anteriores. **b.** brânquias posteriores. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n=4-5$  (pool 5-7 animais). \* diferença significativa em relação ao controle (CT),  $p<0,05$ ; # diferença significativa em relação ao período de anoxia,  $p<0,05$ .



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- BRIDGES, C.R. & BRAND, A.T., 1980. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of some marine Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 65A:399-409.
- BROOKS, S.P.J. & STOREY, K.B., 1997. Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 118(4):1103-1114.
- BUEGE, J.A. & AUST, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52:302-310.
- CORONGIU, F.P. & MILIA, A.A., 1983. An improved method for determining diene conjugation in autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Chem.-Biol. Interact.* 44:289-297.
- CORONGIU, F.P.; BANNI, S. and DESSI, M.A., 1989. Conjugated dienes detected in tissue lipid extracts by second derivative spectrophotometry. *Free Radic. Biol. Med.* 7:183-186.
- EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S. and LISSI, E.A., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potencial (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):261-266.
- FOLCH, J.; LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G.H., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- GILLES, R. & PEQUEUX, A., 1986. Physiological and ultrastructural studies of NaCl transport in crustacean gills. *Bolletino di Zoologia.* 53:173-182.
- GONÇALVES, A.A., 1993. Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) durante anoxia ambiental. Rio Grande: FURG. Monografia (Curso de Graduação em Oceanografia Biológica).
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.C.M., 1999. *Free radicals in biology and medicine.* 3th ed. Oxford University Press Inc., N.Y.
- HERMES-LIMA, M. & STOREY, K.B., 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 268:R1386-R1393.

HERMES-LIMA, M. & STOREY, K.B., 1996. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipiens*. *Am. J. Physiol.* 271:R918-R925.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J.M. and STOREY, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snail. *Comp. Biochem. Physiol.* B120:437-448.

HERMES-LIMA, M. & ZENTENO-SAVÍN, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* C133:537-556.

HILL, A.D.; TAYLOR, A.C. and STRANG, R.H.C., 1991. Physiological and metabolic responses of shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. *J. Exp. Mar. Biol. Eco.* 150:31-50.

HOCHACHKA, P.W. & LUTZ, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* B130:435-459.

LISSI, E.; PASCUAL, C. and DEL CASTILLO, M.D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* 17:299-311.

LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A. and MILEI, S., 1985. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epidrimicin in mice. *Tumor.* 71:241-249.

LUCU, C., 1993. Ion transport in the gill epithelium of aquatic Crustacea. *J. Exp. Zool.* 265:378-386.

LUSHCHAK, V.I.; LUSHCHAK, L.P.; MOTA, A.A. and HERMES-LIMA, M., 2001. Oxidative stress and oxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280:R100-R107.

LUTZ, P.L. & STOREY, K.B., 1997. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: *Handbook of Physiology – Comparative Physiology*. Dantzler, W.H. (ed.), Oxford: American Physiological Society, vol. II.

MANNERVIK, B. & GLUTHENBERG, C., 1981. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology.* 77:231-235.

MARKLUND, S., 1985. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton. CRC Press.

ODUM, E.P., 1985. *Ecologia*. Interamericana (ed), Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, G.T.; ROSSI, I.C. and DA SILVA, R.S.M., 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Casmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Marine Biology.* 139:335-342.

PANNUNZIO, T.M. & STOREY, K.B., 1998. Antioxidant defenses and peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221:277-292.

RUETHER, 1975. *Red cell metabolism*. (Greene & Straton eds.) 2ed. N.Y.

SIEBERS, D.; LEWECK, K.; MARKUS, H. and WINKLER, A., 1982. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Marine Biology*. 36:37-43.

SIES, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91:31S-38S.

STOREY, K.B., 1996a. Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances. *Comp. Biochem. Physiol.* 113:23-35.

STOREY, K.B., 1996b. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1715:1733.

STOREY, K.B. & STOREY, J.M., 1990. Facultative metabolic rate depression: molecular regulation and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quart. Rev. Biol.* 65:145-174.

TAYLOR, A.C. & SPICER, J.I., 1987. Metabolic responses of prawns *Palaemon elegans* (Rathke) and *P. serratus* (Pennant) (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. *Mar. Biol. Berlin*. 95:521-530.

TEAL, J.M. & CAREY, F.G., 1967. The metabolism of marsh crabs under conditions of reduced oxygen pressure. *Physiol. Zool.* 40:83-91.

THOMPSON, R.K. & PRITCHARD, A.W., 1969. Respiratory adaptations of two burrowing crustaceans, *Callinassa californiensis* and *Upogebia pugettensis*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, 136:274-287.

WILLMORE, W.G. & STOREY, K.B., 1997. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Mol. Cell. Biochem.* 170:177-185.

WINSTON, G.W. & DI GIULIO, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.* 19:137-161.

## *TRABALHO 2*

---

**Balanço oxidativo e Imunodeteccção das enzimas antioxidantes SOD e GST  
no hepatopâncreas de caranguejos *Chasmagnathus granulata* submetidos à  
eventos de anoxia/reoxigenação**

Autores: Ubirajara O. de Oliveira & Luiz Carlos Rios Kucharski

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Departamento de  
Fisiologia/Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/UFRGS

**Título de página:** Balanço oxidativo e imunodeteccção no *C. granulata*.

Ubirajara O. de Oliveira

R. Sarmiento Leite, 500 – Campos Centro

Porto Alegre-RS/Brasil

Fone: (51) 3316-3505

Fax: (51) 3316-3166

e-mail: biraoliveira@yahoo.com

## **Resumo**

O presente estudo, mostra a atividade e a concentração das enzimas antioxidantes SOD e GST no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia (8 h) e de recuperação aeróbia (20 e 40 min.). A exposição à anoxia não causou nenhuma alteração na atividade das enzimas analisadas. A atividade destas enzimas parecem não responder a diminuição na concentração do oxigênio ambiental. A reoxigenação causa inicialmente uma redução na atividade destas enzimas, contudo, elas retornam ou tendem a retornar aos níveis do controle. A resposta na concentração da GST (imunodeteccção), segue o mesmo perfil da sua atividade ou vice-versa; contudo, as reduções na atividade desta enzima foram melhor evidenciadas do que as reduções na sua concentração. Por outro lado, a concentração e a atividade da SOD apresentam perfis diferenciados. Durante os períodos experimentais não se observou nenhuma alteração significativa nas defesas antioxidantes não-enzimáticas (TRAP), apesar da tendência de aumento observado na recuperação. A exposição à anoxia causou um aumento da lipoperoxidação (DC e TBA-RS). Entretanto, a recuperação causa uma diminuição da lipoperoxidação em relação ao período de anoxia. Os resultados deste estudo, demonstram que o *C. granulata* apresenta respostas coordenadas em seus sistemas de defesa antioxidantes na tentativa de reduzir e/ou evitar danos decorrentes da reintrodução do oxigênio.

## **Palavras-chave**

Anoxia, Crustáceos, Enzimas antioxidantes, EAO, Imunodeteccção, Lipoperoxidação, Reoxigenação.

## 1. Introdução

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) é uma espécie que habita estuários neotropicais do Brasil, do Uruguai e da Argentina, e assim como, outros organismos estuarinos e lagunares, são submetidos freqüentemente a um elevado estresse ambiental, tolerando amplas variações das características físicas e químicas do ambiente, como temperatura, salinidade e  $O_2$  dissolvido (BOSCHI, 1964; ODUM, 1985).

Muitas espécies de animais são tolerantes à variação do  $O_2$  ambiental. Algumas são anaeróbias facultativas autênticas (crustáceos e moluscos), pois utilizam o  $O_2$  quando presente no meio, mas também, são capazes de sobreviverem por dias ou semanas sem ele (STOREY, 1996; BROOKS & STOREY, 1997).

Para garantir a sobrevivência em situações de hipóxia e/ou anoxia, praticamente todos os filos de invertebrados e vertebrados utilizam uma estratégia em comum, denominada depressão metabólica; que têm o objetivo de preservar as reservas energéticas através da redução na produção e no consumo de energia (LUTZ & STOREY, 1997; PANNUNZIO & STOREY, 1998; HOCHACHKA & LUTZ, 2001).

No entanto, a transição do estado hipometabólico/hipóxico para os níveis metabólicos normais/reoxigenado, pode ser acompanhada por um grande aumento na produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), tais como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), que promovem a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, causando alterações funcionais em células e tecidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; DRÖGE, 2002).

Deste modo, os animais que são regularmente submetidos a eventos de estresse ambiental necessitam de mecanismos que os permitam viver sob estas condições adversas. Esses mecanismos incluem: a) manutenção das altas defesas antioxidantes constitutivas; b) aumento das defesas antioxidantes sob condições de anoxia, na antecipação de sua necessidade quando o O<sub>2</sub> é reintroduzido; c) grande tolerância às EAO ou eficientes mecanismos para sua remoção (PANNUNZIO & STOREY, 1998). Nas últimas duas décadas, esses mecanismos vem sendo estudados em moluscos, peixes, anfíbios e reptéis (ver revisões: WINSTON & DI GIULIO, 1991; STOREY, 1996; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002). Contudo, conhece-se muito pouco sobre os mecanismos adotados pelos crustáceos e, em particular, sobre as defesas antioxidantes dos caranguejos frente ao ciclo natural de disponibilidade de oxigênio.

Em recente estudo, demonstramos que caranguejos *C. granulata* expostos a períodos de anoxia e de reoxigenação, apresentam no tecido branquial alterações na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST), que parecem responder diretamente às variações na concentração do oxigênio ambiental; e que a reoxigenação causa também, alterações na capacidade antioxidante total e na lipoperoxidação dos tecidos analisados (Trabalho 1).

O presente trabalho fornece mais alguns subsídios para compreendermos as estratégias adotadas pelos caranguejos frente ao processo de anoxia-reoxigenação. Onde, determinamos os efeitos da anoxia ambiental e de diferentes períodos de reoxigenação sobre o sistema antioxidante e os níveis de lipoperoxidação no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata*. Através da análise da concentração e da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST,



da avaliação da capacidade antioxidante total (TRAP), assim como, a determinação do dano aos lipídeos (lipoperoxidação) através da mensuração dos níveis de dienos conjugados (DC) e de malondialdeído (TBA-RS).

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Coleta e Manutenção dos Animais*

Para realização deste estudo, foram utilizados caranguejos machos adultos da espécie *Chasmagnathus granulata* no estágio de intermuda, coletados manualmente no estuário às margens da Lagoa de Tramandaí-RS/Brasil. Os caranguejos capturados foram transportados em caixas plásticas com água do próprio local. Os animais foram coletados de acordo com a legislação ambiental brasileira (Portaria 332/90 IBAMA).

Posteriormente, foram selecionados animais com carapaças entre 2,5 e 3 cm de diâmetro (para minimizar os efeitos da idade e do tamanho dos mesmos) e os transferimos para aquários com oxigenação constante, salinidade de 20‰, temperatura média 25°C, fotoperíodo de 12/12 horas claro/escuro e alimentados com carne bovina *ad libitum*, durante 15 dias.

### *2.2. Procedimentos Experimentais*

Após o período de aclimatação, um grupo de animais foi utilizado como controle (CT). Outro grupo animais (grupo anoxia - AX) foi colocado em aquário (previamente aerado com gás nitrogênio - N<sub>2</sub> durante 20 minutos) onde permaneceu por 20 minutos ainda sob constante aeração de N<sub>2</sub> (totalizando 40 minutos de aeração com N<sub>2</sub>). Após este período, o aquário foi hermeticamente

fechado com filme de PVC, e a partir desse momento os animais permaneceram 8 horas em anoxia ambiental. A fase de recuperação (RC), foi realizada colocando-se novamente parte dos caranguejos, em aquário com oxigenação constante, onde permaneceram durante 20 e 40 minutos. Ao final de cada período experimental, um *pool* de 5-7 animais foram imediatamente crioanestesiados e o hepatopâncreas retirado para as determinações bioquímicas.

### 2.3. Preparo dos Homogeneizados

#### 2.3.1. Homogeneizados para TBA-RS , TRAP e Western blot

Os hepatopâncreas foram rapidamente retirados, pesados e homogeneizados por 40 segundos em um homogeneizador Ultra-Turrax, com KCl 1,15% (7 mL/g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 µL/mL de KCl adicionado). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 8.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24, Du Pont Instruments, EUA), e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -70°C para as dosagens posteriores (modificado de LLESUY *et al.*, 1985).

#### 2.3.2. Homogeneizados para SOD e GST

Os hepatopâncreas foram homogeneizados, com Tris-HCl 20 mM e Sacarose 0,5 M (7 mL/g de tecido), mais PMSF 100 mM em isopropanol (10 µL/mL de tampão adicionado). Os procedimentos experimentais foram os mesmos supra citados.

#### 2.4. Determinação das Proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de BRADFORD (1976), usando albumina bovina (1 mg/mL) como padrão.

#### 2.5. Enzimas Antioxidantes

##### 2.5.1. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método adaptado de BOVERIS *et al.* (1983), segundo o nível de inibição da auto-oxidação da adrenalina. Alíquotas dos homogeneizados (5  $\mu$ L) foram adicionadas a um Tampão Glicina-NaOH 50 mM (pH 10) contendo 60 mM de adrenalina, num volume final de 1 mL. As mudanças na absorbância a 480 nm foram observadas, durante um intervalo de 2 min. A atividade da enzima foi determinada a partir de uma curva padrão de SOD, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação da adrenalina. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

##### 2.5.2. Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada num meio de reação contendo: tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), GSH 1 mM, CDNB 1 mM e 50  $\mu$ L de homogeneizado. A formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutathione (DNP-SG) foi monitorada a 340 nm por 2 min. Os resultados foram expressos em U GST/mg de proteína, onde 1 U corresponde a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1  $\mu$ mol de DNP-SG por minuto (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981).

## 2.6. Western blot e Imunodeteção

Os homogeneizados foram incubados em Tampão Laemmli por 5 min. à 100°C (concentração final de 3 µg/µL de proteína). Submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida - SDS- 15% (15 µL por poço), seguida de transferência para a membrana de nitrocelulose (Hybond ECL – Amersham, IL, USA) usando um sistema “Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell”.

As membranas foram bloqueadas por 1 hora à 25°C em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em NET (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 25 mM, Triton 0,05%, Gelatina 0,25%; pH 7,4)), seguida de incubação com o anticorpo específico SOD (Anti-SOD<sub>CuZn</sub> sheep polyclonal IgG – Up State) ou GST (Anti-GST rabbit polyclonal IgG – Up State) na diluição (1:1.000 em NET) por 16 horas a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com NET (5X de 10 min.), e incubadas com o apropriado segundo anticorpo-HRP conjugado (1:10.000 em NET) por 1 hora a 25°C. Após lavar novamente as membranas, as proteínas de interesse foram reveladas em filme radiográfico utilizando-se um Kit-ECL (Amersham, IL, USA). Utilizou-se um marcador de peso molecular (RPN 800 Full Range Rainbow - Amersham, IL, USA) e a densidade óptica das bandas imunoreativas foram analisadas por um densitômetro (VDS, Pharmacia).

## 2.7. Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

A determinação da TRAP baseou-se na decomposição do 2,2' Azo-bis (2-amidinopropano) dihidroclorato (0,5% em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4), utilizando-se o luminol (1 mg/mL em NaOH 0,1N) como fonte de quimiluminescência. O tempo de indução (T<sub>i</sub>) foi utilizado para avaliar a quantidade relativa de antioxidantes presentes na amostra utilizando-se o trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão. As medidas foram realizadas em um

contador de radioatividade beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. Os resultados foram expressos em mM de Trolox /  $\mu$ l de amostra (LISSI *et al.*, 1992; EVELSON *et al.*, 2001).

## 2.8. Lipoperoxidação

### 2.8.1. Dienos Conjugados (DC)

A determinação dos dienos conjugados vem sendo amplamente utilizada como um índice dos primeiros eventos da lipoperoxidação. Os hepatopâncreas foram homogeneizados 1:15 (P/V) em cloroformio/metanol 2:1 (V/V), e centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm. A fase líquida foi misturada em ácido sulfúrico/H<sub>2</sub>O 1:2.000 (V/V) em igual volume e novamente centrifugadas. A fase superior foi aspirada, e a fase inferior aerada com N<sub>2</sub> para a obtenção dos lipídios, que foram pesados e redissolvidos em hexano, obtendo uma concentração final de 2 mg/mL. O conteúdo de dienos conjugados nos lipídeos foi determinado pela segunda derivada espectrofotométrica (diferença entre os picos de absorbância a 240 e 233 nm, que representam respectivamente, os *cis-trans* e *trans-trans* estereoisômeros de dienos conjugados). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de absorbância d<sup>2</sup>A/mg de lipídeos (FOLCH *et al.*, 1957; CORONGIU & MILIA, 1983; CORONGIU *et al.*, 1989).

### 2.8.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

A concentração de malondialdeído e outros aldeídos, produtos característicos do estágio terminal da lipoperoxidação, foram determinados pelo método de BUEGE & AUST (1978). Adicionou-se 0,25 mL de homogeneizado em 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (P/V), centrifugou-se à 3.000 rpm

por 5 minutos. Retirou-se 0,5 mL do sobrenadante, que foi misturado a 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V). Esta mistura foi aquecida por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada no gelo. Após, realizou-se a leitura da absorbância à 535 nm, em espectrofotômetro marca Varian modelo Cary. Os resultados são expressos em nmoles de TBA-RS/mg de proteína, usando um coeficiente de extinção de 156 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

### 2.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK), ou teste t de Student para amostras independentes. Utilizou-se o programa Sigma Stat 2.0 para Windows, sendo as diferenças consideradas significativas para p<0,05.

## 3. Resultados

### 3.1. Atividade das Enzimas Antioxidantes

A atividade e a concentração das enzimas antioxidantes SOD e GST no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia (8 h) e de recuperação aeróbia (20 e 40 min.) após a anoxia, estão representadas na tabela 1. A exposição a anoxia não causou nenhuma alteração significativa na atividade das enzimas analisada (SOD e GST) em relação aos seus respectivos controles. Após 20 min. de recuperação, ambas enzimas apresentaram uma redução em sua atividade (21% e 65% em relação aos valores de controle para SOD e GST, respectivamente). Após 40 min. de recuperação, enquanto a atividade da SOD retornou aos valores de controle, a atividade da GST ainda

encontrava-se significativamente reduzida (46% em relação aos valores de controle).

### 3.2. Concentração das Enzimas Antioxidantes (Western blot e Imunodeteção)

A enzima GST, assim como, sua atividade não apresentou nenhuma alteração significativa na sua concentração frente a exposição à anoxia (tabela 1 e figura 1). Durante os períodos de recuperação, observou-se uma redução significativa na concentração da GST (14% e 19% em relação aos valores de controle, aos 20 e 40 min. de recuperação, respectivamente). A SOD<sub>CuZn</sub> não apresentou nenhuma alteração significativa na sua concentração durante os períodos experimentais; contudo, apresentou uma diminuição aos 20 min. de recuperação (12% em relação aos valores de controle). Como observado na figura 1, a imunodeteção da SOD<sub>CuZn</sub> apresentou uma banda única, fortemente marcada, pesando ~ 57 KDa. Já a GST apresentou três bandas, uma bem marcada pesando ~ 57 KDa e duas levemente marcadas pesando ~ 43 e ~ 34 KDa. Os valores para GST apresentados na tabela 1, representam a soma das três bandas identificadas.

### 3.3. Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

A figura 2 mostra a determinação da capacidade antioxidante total (TRAP), no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia (8 h) e de recuperação aeróbia (20 e 40 min.) após a anoxia. A exposição à anoxia não causou nenhuma alteração significativa nas defesas antioxidantes não-enzimáticas. Após 20min. de recuperação, a capacidade antioxidante total apresentou um aumento (212%), apesar de não ser significativo em relação ao controle. Aos 40 min. de recuperação as defesas antioxidantes não-enzimáticas

não apresentaram nenhuma alteração significativa em relação aos valores de controle.

### 3.4. Produtos da Lipoperoxidação

A figura 3 mostra os efeitos da exposição a anoxia (8 h) e da recuperação aeróbia (20 e 40 min.) após a anoxia, sobre o conteúdo dos dienos conjugados (DC) (estágio inicial da peroxidação lipídica) determinados no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata*. A exposição à anoxia causou no hepatopâncreas, um aumento significativo nos níveis dos DC (121% em relação aos valores de controle). Durante os períodos de recuperação, observou-se uma redução significativa nos níveis de DC (29% e 38% em relação aos valores de controle, aos 20 e 40 min. de recuperação, respectivamente).

A concentração de malondialdeído e outros aldeídos (produtos do estágio final da peroxidação lipídica) foram determinados pela reação com o ácido tiobarbitúrico (figura 4). A exposição à anoxia causou um aumento significativo nos níveis de TBA-RS (160% em relação aos níveis de controle). Durante os períodos de recuperação os níveis de TBA-RS apresentaram-se reduzidos em relação ao período de anoxia, mas ainda continuaram significativamente aumentados em relação aos valores de controle (141% e 125% aos 20 e 40 min. de recuperação, respectivamente).

## 4. Discussão

A transição do estado hipometabólico/hipóxico para o estado metabólico normal/reoxigenado pode ser acompanhada por um grande aumento na produção das EAO, que pode causar danos aos tecidos biológicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Os efeitos desta transição (danos as biomoléculas e



atividade das enzimas antioxidantes) vêm sendo observados em várias espécies (ver revisões: WINSTON & DI GIULIO, 1991; STOREY, 1996; HOCHACHKA & LUTZ, 2001; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002). Entretanto, estudos utilizando técnicas de imunodeteção para analisar possíveis variações na concentração das enzimas antioxidantes são muito escassos, principalmente em organismos aquáticos.

Os resultados do presente estudo mostram a atividade e a concentração das enzimas antioxidantes SOD e GST no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia e de recuperação aeróbia. Como, representado na tabela 1, a exposição à anoxia não causou nenhuma alteração significativa na atividade das enzimas analisadas em relação aos seus respectivos controle. Os resultados encontrados no fígado do peixe-dourado *Carassius auratus* (LUSHCHAK *et al.*, 2001) e da rã leopardo *Rana pipiens* (HERMES-LIMA & STOREY, 1996), também, não apresentaram nenhuma alteração na atividade destas enzimas quando expostos à períodos de anoxia. A manutenção da atividade das enzimas antioxidantes revela sua importância para os mecanismos de sobrevivência a anoxia (HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002), uma vez que sua atividade não precisa ser regulada para contrabalançar o rápido aumento na produção do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) que ocorre na reoxigenação. A atividade destas enzimas no hepatopâncreas, contrariamente as respostas observadas nas brânquias deste mesmo animal (Trabalho 1), parecem não responder à diminuição na concentração do oxigênio ambiental. Diferentemente dos resultados encontrados no fígado do *Carassius auratus* e da *Rana pipiens*, que mantiveram a atividade das enzimas SOD e GST, durante o período de recuperação; no hepatopâncreas do *C. granulata* a atividade destas

enzimas apresentaram-se reduzidas aos 20 min. de reoxigenação. A redução na atividade da GST pode ser causada por um possível aumento na produção de  $O_2^{\bullet-}$ , causado pela reoxigenação. O  $O_2^{\bullet-}$  pode também inibir a CAT e outras GPXs, diminuindo sua capacidade em detoxificar o  $H_2O_2$  produzido pela SOD. O acúmulo de seu produto ( $H_2O_2$ ) pode ser o responsável pela inibição observada na SOD (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Já aos 40 min. de recuperação, a atividade da SOD retorna a seus níveis normais. Este aumento da SOD promove a remoção do  $O_2^{\bullet-}$ , diminuindo sua inibição sobre a GST, que apresenta-se aumentada em relação ao período de 20 min. de recuperação.

Os resultados da atividade da SOD, não podem ser totalmente creditados a  $SOD_{CuZn}$ , pois acredita-se que o caranguejo *C. granulata* também apresente a  $SOD_{Mn}$ , já que a mesma foi encontrada em outros crustáceos como seus congêneres *Callinectes sapidus* (BROUWER *et al.*, 1997) e *Carcinus maenas* (ORBEA *et al.*, 2000). Não foi utilizado um inibidor para a  $SOD_{Mn}$  pois as medidas foram realizadas em meio alcalino (pH 10), que reduz sua atividade. Além disso, a atividade da  $SOD_{Mn}$  é em torno de 10% da atividade total da SOD em fígado de rato, e se a inibição apresentada na atividade da SOD for mesmo causada pelo  $H_2O_2$ , provavelmente tratar-se da  $SOD_{CuZn}$ , pois a  $SOD_{Mn}$  não é inibida pelo  $H_2O_2$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os dados apresentados na figura 1 e tabela 1, demonstram que a resposta na concentração da GST no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata*, segue o mesmo perfil da sua atividade ou vice-versa, estando de acordo com o conhecimento de que esta enzima não é regulada por fatores pós-transcricionais; contudo, as reduções observadas na atividade desta enzima foram marcantes quando comparadas com as reduções na sua concentração. A

resposta na concentração e na atividade da SOD, entretanto, apresentam perfis diferenciados; o que pode dever-se ao fato de que na atividade mediu-se o conjunto de todas as isoformas e na concentração avaliou-se a isoforma CuZn dependente. Estes resultados sugerem que atividade e concentração destas enzimas, não são influenciadas pelos mesmos estímulos e/ou respondem a eles de maneira diferente. A maior estabilidade da SOD<sub>CuZn</sub> frente as alterações metabólicas ocorridas durante os períodos experimentais quando comparada a GST, confirmam sua alta resistência ao calor, ao ataque de proteases, a uréia, entre outras substâncias (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A SOD<sub>CuZn</sub> (~ 57 KDa) encontrada no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* coincide com uma das formas da SOD<sub>CuZn</sub> bovina (55-60 KDa) (ABERNETHY *et al.*, 1974; STEINMAN *et al.*, 1974). No hepatopâncreas do *C. granulata* encontramos isoformas da GST com massa molecular de ~ 57, ~ 43 e ~ 34 KDa, que coincidem ou aproximam-se das isoformas encontradas em outros crustáceos, *Daphnia magna* (30,2 e 55-61 KDa) (LeBLANC & COCHRANE, 1987) e *Callinectes sapidus* (40,8 KDa) (KEERAN & LEE, 1987). A GST distribui-se em no mínimo nove diferentes classes citosólicas, de acordo com suas propriedades funcionais e estruturais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; ANGELUCCI *et al.*, 2002). A análise individual de cada uma das isoformas da GST encontradas neste estudo, foge aos nossos objetivos, pois buscamos uma compreensão geral do comportamento destas enzimas. Deste modo, optamos por utilizar a soma das três isoformas detectadas para expressar a concentração total da GST.

A imunodeteção da SOD<sub>CuZn</sub> no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* (presente estudo), assim como no caranguejo *Carcinus maenas* (ORBEA *et al.*, 2000), sugerem que a presença desta, representa uma possível

adaptação evolutiva destas espécies, habilitando-as a viver sob condições extremas impostas pelo ambiente estuarino, já que seu congêneres marinho *Callinectes sapidus* não apresenta esta enzima (BROUWER *et al.*, 1997).

Durante os períodos experimentais não se observou nenhuma alteração significativa nas defesas antioxidantes não-enzimáticas (TRAP) no hepatopâncreas do *C. granulata* (figura 2). A grande tendência ao aumento observada aos 20 min. de recuperação (212%) provavelmente não foi significativa devido ao pequeno número de amostras e a própria variabilidade intrínseca do método. Contudo, segue o perfil de estudos realizados em outras espécies aquáticas (ver revisão: WINSTON & DI GIULIO, 1991), que demonstram um aumento nos antioxidantes de baixo peso molecular quando expostos à situações de estresse; numa possível tentativa de impedir o dano oxidativo na fase de recuperação, pois os antioxidantes não-enzimáticos atuam como *scavengers/quenchers* de EAO e/ou podem quelar ions metálicos diminuindo sua capacidade de gerar EAO (SIES, 1991; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999); ou ainda, na tentativa de remover os produtos do metabolismo anaeróbio, acumulados durante a anoxia (PANNUNZIO & STOREY, 1998).

Como observado nas figuras 3 e 4, a exposição a anoxia causou um aumento significativo da lipoperoxidação no hepatopâncreas do *C. granulata*; que pode ser causado pelos altos níveis de atividade enzimática (glicogenólise e/ou gliconeogênese) apresentados neste órgão durante a anoxia (OLIVEIRA *et al.*, 2001). A diminuição nos níveis de DC e de TBA-RS em relação ao período de anoxia, observados aos 20 min. de recuperação mesmo com a atividade da SOD e da GST diminuídas, sugerem que a tendência de aumento observado nos antioxidantes não-enzimáticos (TRAP) seja responsável por esta diminuição, pois

a CAT e a GPx, assim como a GST, podem estar inibidas pelo possível aumento do  $O_2^{\bullet-}$ . Já a significativa redução nos níveis do TBA-RS em relação ao período de anoxia, observada aos 40 min. de recuperação provavelmente se deva ao aumento significativo da atividade da GST em relação ao período anterior (20 min.). Aumentando assim, a remoção de produtos finais da lipoperoxidação e/ou do metabolismo anaeróbico acumulados durante a anoxia (PANNUNZIO & STOREY, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os resultados apresentados neste estudo, demonstram que o *C. granulata*, assim como outras espécies que estão naturalmente expostas a períodos anoxia/hipoxia e reoxigenação, apresenta respostas coordenadas em seus sistemas de defesas antioxidantes na tentativa de reduzir e/ou evitar danos decorrentes da reintrodução do oxigênio.

### ***Agradecimentos***

Gostaríamos de agradecer à Profa. Dra. Roselis S. M. da Silva, à Profa. Dra. Adriane Belló Klein, à Profa. Dra. Maria Flávia M. Ribeiro e ao Prof. Dr. Paulo Ivo H. B. Júnior pelo auxílio incondicional; aos colegas do Lab. de Metabolismo e Endocrinologia Comparada; a CAPES e a FAPERGS pelo auxílio financeiro.

## Tabelas

**Tabela 1.** Efeitos da exposição a anoxia e da recuperação aeróbia sobre a atividade e a concentração das enzimas antioxidantes SOD e GST no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata*

	Atividade		Concentração	
	SOD (U/mg)	GST (mU/mg)	SOD (pixel)	GST (pixel)
Controle	1,09±0,13	1,01±0,11	109,0±4,2	289,5±4,9
Anoxia - 8 h	1,08±0,08	1,17±0,03	105,0±1,4	294,2±3,8
Recuperação 20 min.	0,86±0,18 <sup>a,b</sup>	0,35±0,03 <sup>a,b</sup>	95,5±2,1	248,6±12,2 <sup>a,b</sup>
Recuperação 40 min.	1,19±0,06 <sup>c</sup>	0,55±0,14 <sup>a,b,c</sup>	108,5±9,2	233,7±1,8 <sup>a,b</sup>

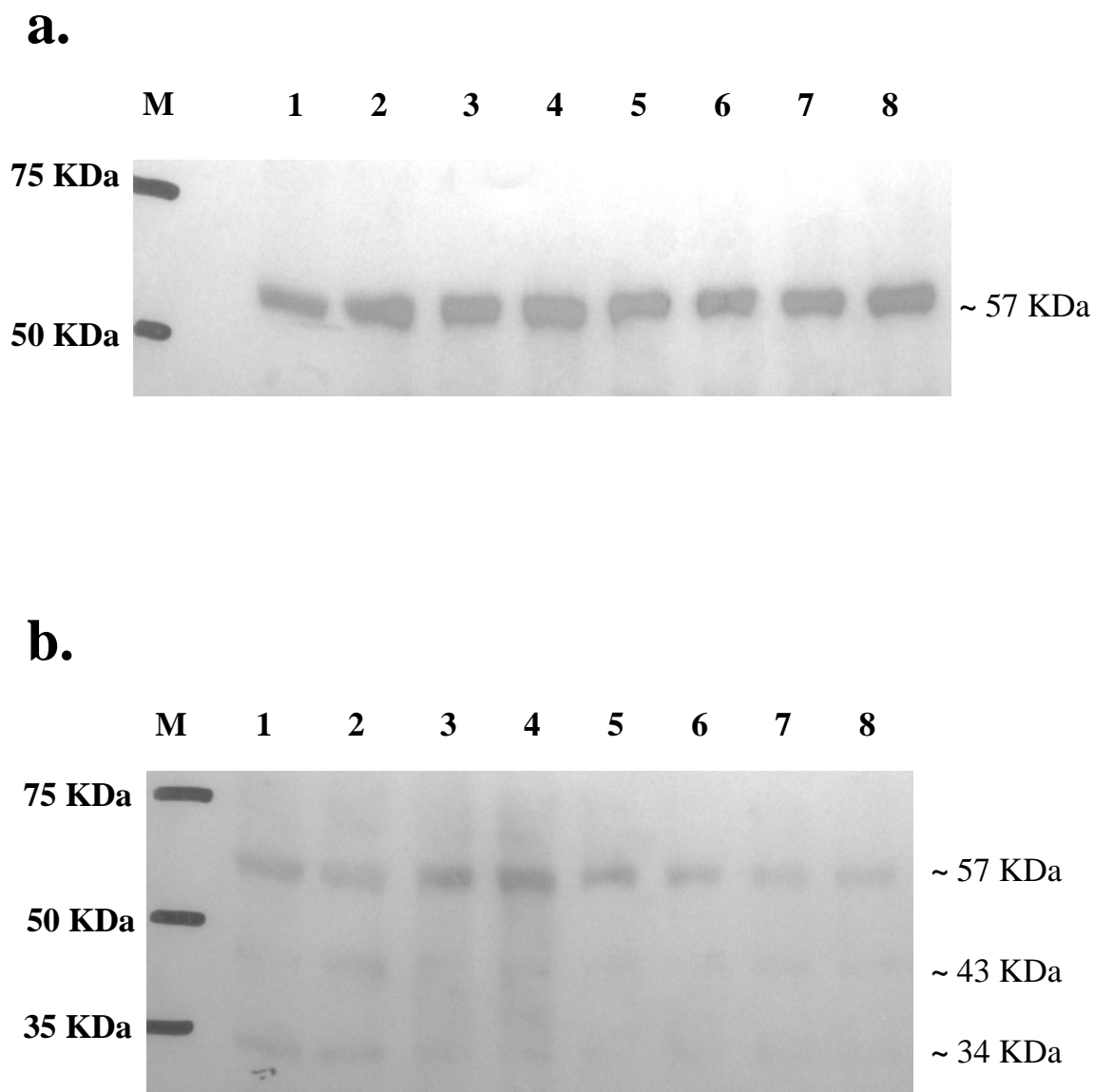
As atividades estão expressas por mg de proteína, média±desvio padrão,  $n=3-4$  (pool 5-7 animais).

As concentrações das enzimas imunoreativas determinadas por densidade óptica, estão expressas em pixel, média±desvio padrão,  $n=2$  (pool 5-7 animais).

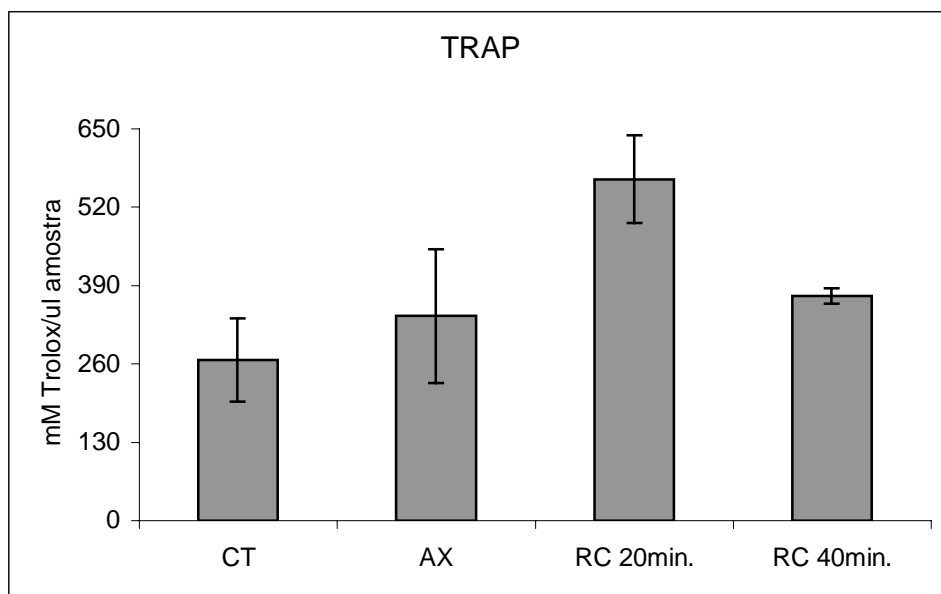
<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle correspondente,  $p<0,05$ .

<sup>b</sup> Significativamente diferente do período de anoxia,  $p<0,05$ .

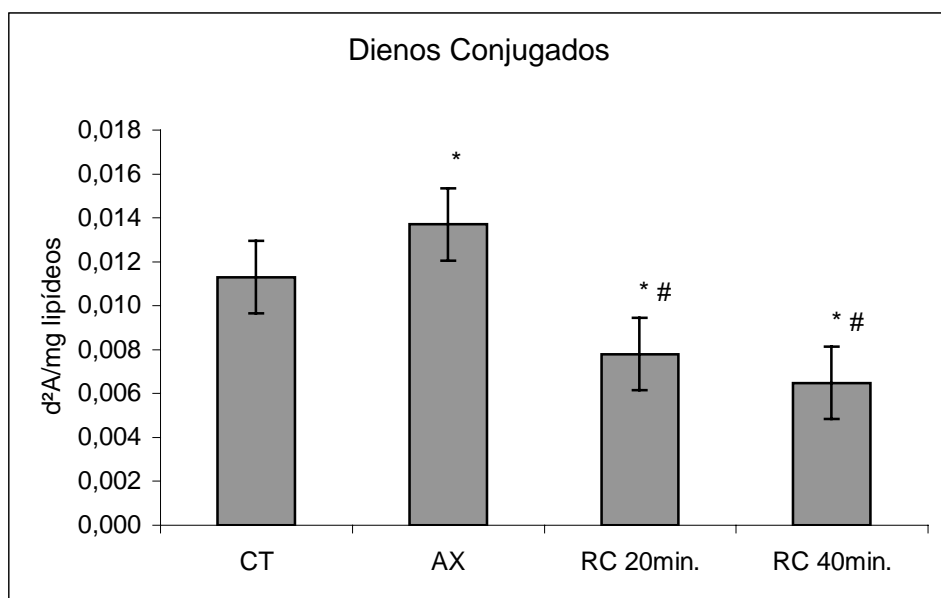
<sup>c</sup> Significativamente diferente do período precedente,  $p<0,05$ .

**Figuras**

**Figura 1.** Western blots das enzimas antioxidantes ( $SOD_{CuZn}$  e GST) no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia - 8 h e de recuperação aeróbia - RC após a anoxia. **a.**  $SOD_{CuZn}$ . **b.** GST. Marcador de peso molecular (M); Controle (linhas 1 e 2); Anoxia (linhas 3 e 4); RC 20 min. (linhas 5 e 6); RC 40min. (linhas 7 e 8). A média dos valores dados em *pixel* estão representados na tabela 1.

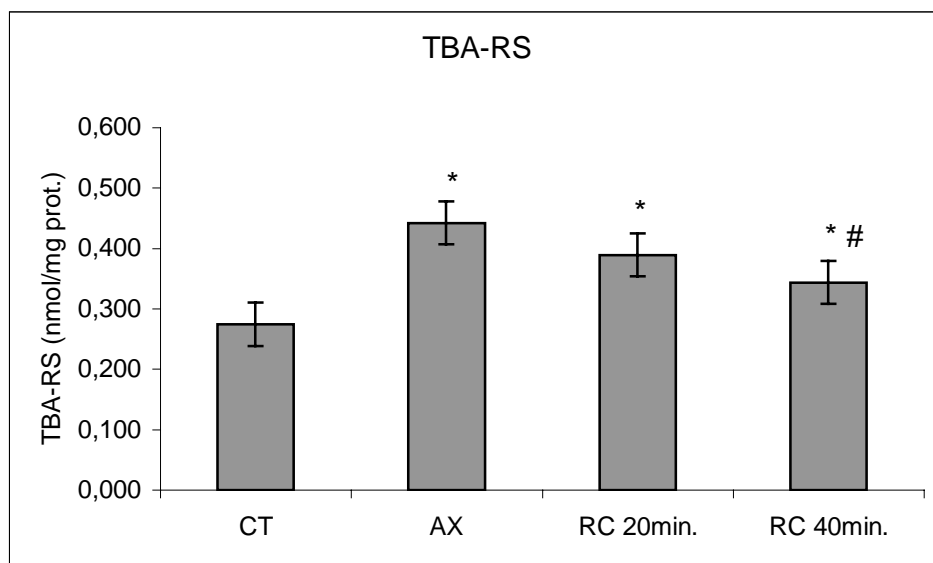


**Figura 2.** Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia - 8 h (AX) e de recuperação aeróbia (RC 20min. e RC 40min.) após a anoxia. Grupo controle (CT). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n=2$  (pool 5-7 animais). Não há diferença significativa entre os períodos experimentais.



**Figura 3.** Determinação do conteúdo de dienos conjugados (DC) no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia - 8 h (AX) e de recuperação aeróbia (RC 20min. e RC 40min.) após a anoxia. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n=4-5$  (pool 5-7 animais). \* diferença significativa em relação ao controle (CT),  $p<0,05$ ; # diferença significativa em relação ao período de anoxia,  $p<0,05$ .





**Figura 4.** Determinação do conteúdo das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a períodos de anoxia - 8 h (AX) e de recuperação aeróbia (RC 20min. e RC 40min.) após a anoxia. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n=4-5$  (pool 5-7 animais). \* diferença significativa em relação ao controle (CT),  $p<0,05$ ; # diferença significativa em relação ao período de anoxia,  $p<0,05$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNETHY, J.L.; STEINMAN, H.M. and HILL, R.L., 1974. Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Subunit structure and sequence location of the intrasubunit disulfide bond. *J. Biol. Chem.* 249(22):7339-7347.

ANGELUCCI, S.; SACCHETTA, P.; DE LUCA, A.; MOIO, P.; AMICARELLI, F. and DI ILIO, C., 2002. Glutathione transferase isoenzymes from frog (*Xenopus laevis*) liver and embryo. *Biochim. Biophys. Acta.* 1569:81-85.

BEISIEGEL, U., 1986. Protein blotting. *Eletroforesis.* 7:1-18.

BOSCHI, E.E., 1964. Los crustáceos decapodes brachyura del litoral bonaerense. *Bol. Inst. Biol. Mar., Mar del Plata* 6:1-76.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I. and KOCH, O.R., 1983. Increased chemi-luminescence and superoxido production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227:534-541.

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.

BROOKS, S.P.J. & STOREY, K.B., 1997. Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 118(4):1103-1114.

BROUWER, M.; HOEXUM BROUWER, T; GRATER, W.; ENGHILD, J. and THOGERSEN, I., 1997. The paradigm that all O<sub>2</sub> –respiring eukariotes have cytosolic CuZnSOD and that MnSOD is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochem.* 36:13381-13388.

BUEGE, J.A. & AUST, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52:302-310.

CORONGIU, F.P. & MILIA, A.A., 1983. An improved method for determining diene conjugation in autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Chem.-Biol. Interact.* 44:289-297.

CORONGIU, F.P.; BANNI, S. and DESSI, M.A., 1989. Conjugated dienes detected in tissue lipid extracts by second derivative spectrophotometry. *Free Radic. Biol. Med.* 7:183-186.

DRÖGE, W., 2002. The plasma redox state and ageing. *Ageing Research Reviews* 1:257-278.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S. and LISSI, E.A., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potencial (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):261-266.

- FOLCH, J.; LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G.H., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- GERSHONI, J.M. & PALADE, G.E., 1983. Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* 131:1-13.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.C.M., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3th ed. Oxford University Press Inc., N.Y.
- HERMES-LIMA, M. & STOREY, K.B., 1996. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipiens*. *Am. J. Physiol.* 271:R918-R925.
- HERMES-LIMA, M. & ZENTENO-SAVÍN, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* C133:537-556.
- HOCHACHKA, P.W. & LUTZ, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* B130:435-459.
- KEERAN, W.S. & LEE, R.F., 1987. The purification and characterization of glutathione-S-transferase from the hepatopancreas of the blue-crab, *Callinectes Sapidus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 255(2):233-243.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- LeBLANC, G.A. & COCHRANE, B.J., 1987. Identification of multiple glutathione S-transferases from *Daphnia magna*. *Com. Biochem. Physiol.* B88(1):39-45.
- LISSI, E.; PASCUAL, C. and DEL CASTILLO, M.D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* 17:299-311.
- LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A. and MILEI, S., 1985. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epidrimicin in mice. *Tumor.* 71:241-249.
- LUSHCHAK, V.I.; LUSHCHAK, L.P.; MOTA, A.A. and HERMES-LIMA, M., 2001. Oxidative stress and oxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280:R100-R107.
- MANNERVIK, B. & GLUTHENBERG, C., 1981. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology.* 77:231-235.
- ODUM, E.P., 1985. *Ecologia*. Interamericana (ed), Rio de Janeiro.
- OLIVEIRA, G.T.; ROSSI, I.C. and DA SILVA, R.S.M., 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Casmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Marine Biology.* 139:335-342.

ORBEA, A.; FAHIMI, H.D. and CAJARAVILLE, M.P., 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of molluscs and crustaceans and fish liver. *Histochem. Cell. Biol.* 114:393-404.

PANNUNZIO, T.M. & STOREY, K.B., 1998. Antioxidant defenses and peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221:277-292.

SIES, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91:31S-38S.

STEINMAN, H.M.; NAIK, V.R.; ABERNETHY, J.L.; and HILL, R.L., 1974. Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Complete aminoacid sequence. *J. Biol. Chem.* 249(22):7326-7338.

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

WILSON, K. & WALKER, J.M., 1994. *Principles and techniques of practical biochemistry*. 4th ed. Cambridge University Press, New York.

WINSTON, G.W. & DI GIULIO, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.* 19:137-161.

## **CONCLUSÃO GERAL**

Os resultados destes estudos, demonstram que os tecidos do caranguejo *Chasmagnathus granulata* quando expostos à períodos de anoxia e de reoxigenação, respondem a estes de maneira diferenciada.

Nas branquias, as alterações observadas na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST) durante os períodos experimentais, parecem responder diretamente às variações na concentração do oxigênio ambiental. A reoxigenação causa também, alterações na capacidade antioxidante total e na lipoperoxidação desses tecidos (Trabalho 1).

No hepatopâncreas, a lipoperoxidação parece ser influenciada indiretamente pelas variações na concentração do oxigênio ambiental; entretanto, a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e GST) parecem não responder a diminuição na concentração do oxigênio; já a reoxigenação causa alterações na atividade dessas enzimas e também, sugerem modificações na capacidade antioxidante total (Trabalho 2).

Os altos níveis de atividade da SOD e da capacidade antioxidante total no hepatopâncreas, quando comparado as brânquias, demonstraram que ele é mais eficiente para impedir/reparar o início da peroxidação lipídica (DC); mas seus baixos níveis de atividade da GST, quando comparado as brânquias, demonstram que ele é menos eficaz na remoção dos produtos finais da lipoperoxidação (TBA-RS).

O perfil destas respostas, corroboram com a teoria da personalidade tecidual e sugerem que no tecido branquial as enzimas antioxidantes teriam um

papel primordial sob as defesas não-enzimáticas, ao contrário do hepatopâncreas, onde as defesas não-enzimáticas teriam maior destaque.

Estes estudos, demonstram que o caranguejo *C. granulata*, assim como, outras espécies intertidais que estão expostas a ciclos naturais de anoxia/hipoxia e reoxigenação, apresenta respostas coordenadas em seus sistemas de defesa antioxidantes na tentativa de reduzir e/ou evitar danos decorrentes da reintrodução do oxigênio; desse modo, tornando-se capaz de ocupar e de manter-se em ambientes com extremas variações das características físico-químicas, como os estuários. E estas constantes situações de estresse oxidativo podem levar à relativa proteção antioxidante apresentada nos caranguejos *C. granulata*.