

Influência de extratos aquosos de uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* nas reações de fase II e atividade da calpaína em diferentes órgãos da carpa comum (*Cyprinus carpio*, Teleostei: Cyprinidae)

Lílian Lund Amado, Márcia Longaray Garcia, Patrícia Baptista Ramos, João Sarkis Yunes, José Maria Monserrat

Introdução

Microcistinas (MIC) são toxinas produzidas por diversos gêneros de cianobactérias, mais comumente pelo gênero *Microcystis* (Erdner et al., 2008). Sabe-se que as MIC são substratos da enzima glutathione-S-transferase (GST) que catalisa reações de fase II de detoxificação (Pflugmacher et al., 1998). A GST interage com as MIC, utilizando glutathione (GSH) como co-substrato, o que possibilita mecanismos de toxicidade adicionais como o estresse oxidativo (Runnegar et al., 1995). Portanto, é importante considerar a resposta em distintos órgãos, já que em peixes diferenças entre órgãos vêm sendo descritas a respeito de geração de estresse oxidativo e/ou a alteração de defesas antioxidantes (Amado et al., 2009). Outro mecanismo de toxicidade provocado pelas MIC são respostas apoptóticas, o que vem sendo demonstrado em estudos *in vitro* (Botha et al., 2004). Neste estudo avaliaram-se os efeitos de extratos aquosos de células liofilizadas de *Microcystis aeruginosa* sobre a capacidade de detoxificação e ativação de uma protease apoptótica (calpaína) na carpa comum *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cyprinidae).

Metodologia

Quarenta carpas foram separadas em 4 grupos experimentais: (1) Controle, tratadas com água MilliQ (CTR), (2) carpas tratadas com extrato aquoso de uma cianobactéria não produtora de microcistina, *Aphanotece* sp. (APHA), (3) carpas tratadas com o extrato aquoso de uma cianobactéria tóxica, *M. aeruginosa* (cepa RST 9501) com uma concentração final de MIC de 25µg/kg (MIC25) e (4) 50µg/kg (MIC50). Os extratos foram preparados utilizando células liofilizadas de ambas as espécies de cianobactérias, que foram submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento visando a liberação da toxina (MIC). Logo após os animais foram gavados com as soluções aquosas de cianobactérias ou água MilliQ. O experimento foi conduzido por 48h, sendo aplicadas duas gavagens, com um intervalo de 24h. Os parâmetros analisados no fígado, cérebro, músculo e brânquias foram: competência antioxidante contra radicais peroxil (ANCOMROS), atividade das enzimas glutathione-S-transferase (GST), glutamato cisteína ligase (GCL), glutathione redutase (GR) e calpaína, e a concentração de glutathione reduzida (GSH).

Resultados e Discussão

Os efeitos mais marcantes foram no fígado, o que condiz com o fato das MIC serem consideradas hepatotoxinas (Runnegar et al., 1995). Neste órgão, apesar da ANCOMROS ter sido maior ($p < 0,05$) nas carpas dos grupos MIC25 e MIC50, observou-se uma diminuição na atividade da GST, que foi acompanhada por uma menor concentração de GSH e atividade da GCL em carpas do grupo MIC50 (Fig. 1).

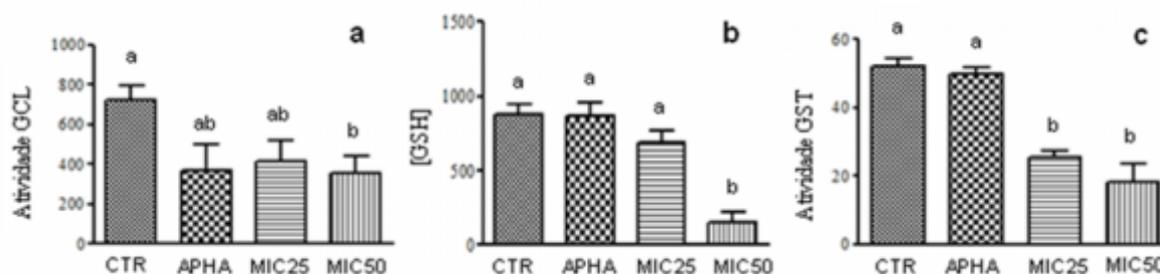


Fig.1: (a) atividade da GCL (nm GSH/mg proteínas/10 min); (b) concentração de GSH (nm GSH/mg proteínas); (c) atividade da GST (nmoles de CNB-GSH/min/mg proteínas) no fígado de *Cyprinus carpio*. CTR: controle; APHA: carpas gavadas com *Aphanotece* sp; MIC 25 e MIC 50: carpas gavadas com 25 μ g MIC/Kg e 50 μ g MIC/Kg, respectivamente. Dados expressos como média \pm 1 EP (n =11-4). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Foi observado um aumento da atividade da calpaína no fígado de carpas expostas a ambas as doses de MIC (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade da calpaína. CTR: controle; MIC25: carpas gavadas com 25 μ g MIC/Kg e MIC 50: carpas gavadas com 50 μ g MIC/Kg. Dados expressos como média \pm 1 EP das unidades de fluorescência (UF) (n =11-4).

Tratamento	Atividade da Calpaína	% de aumento (CTR)
CTR	405.828,8 \pm 21.722,2 UF	-
MIC25	5.788.860 \pm 224.797 UF	1.426%
MIC50	3.266.312 \pm 311.182 UF	805%

Conclusão

A ingestão de MIC afeta o estado redox através da redução da concentração de GSH, provavelmente decorrente da queda na atividade da enzima envolvida na sua síntese, a GCL. A MIC também diminuiu a capacidade de detoxificação do fígado, já que se verificou uma redução significativa da atividade da GST. A alteração do estado redox celular pode ser uma das causas da ativação da calpaína, direcionando as células à apoptose.

Referências bibliográficas

Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of The Total Environment* 407, 2115-2123.

Botha, N., Gehringer, M.M., Downing, T.G., Venter, M.v.d., Shephard, E.G., 2004. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicol* 43, 85-92.

Erdner, D., Dyble, J., Parsons, M., Stevens, R., Hubbard, K., Wrabel, M., Moore, S., Lefebvre, K., Anderson, D., Bienfang, P., Bidigare, R., Parker, M., Moeller, P., Brand, L., Trainer, V., 2008. Centers for Oceans and Human Health: a unified approach to the challenge of harmful algal blooms. *Environmental Health* 7, S2.

Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1425, 527-533.

Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S.M., Lee, E.Y.C., Zhang, L.F., 1995. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatase 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216, 162-169.