

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO COBRE SOBRE O METABOLISMO DA GLUTATIONA EM HEPATÓCITOS DE *Danio rerio*¹

Regina Coimbra Rola²; Carlos Eduardo da Rosa³; Juliana Zomer Sandrini³, Luiz Eduardo Maia Nery³; Gilma Santos Trindade³; Luis Fernando Marins³

Introdução

O cobre é um metal de transição com efeitos diferenciais em animais aquáticos, dependendo da sua concentração na água. Seus efeitos tóxicos são atribuídos à sua capacidade de induzir a formação espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à participação nas reações de Fenton e Harber-Weiss (Bopp et al., 2008).

Para contrabalançar os efeitos deletérios da produção de EROs, os organismos aeróbicos possuem um complexo sistema de defesa antioxidante. O tripeptídeo glutationa (GSH), o qual é o tiol não-protéico intracelular mais abundante, é considerado a primeira linha de defesa de um organismo contra as EROs (Dickinson e Forman, 2002). Sua síntese é realizada em dois passos, sendo o primeiro catalisado pela enzima Glutamato-cisteína ligase (GCL) e o segundo pela enzima GSH-sintase (GS). Este processo acontece constitutivamente na maioria das células, mas pode ser aumentada em resposta a diversos estressores (Iles e Liu, 2005). Ainda, podemos destacar a enzima GSH-redutase (GR), que tem a função de re-reduzir a glutationa oxidada (GSSG) pela ação de EROs ou pela ação da GSH-peroxidase (GPx). O estudo objetivou avaliar os efeitos do cobre sobre os níveis intracelulares da GSH e a expressão de genes envolvidos no seu metabolismo em uma cultura de hepatócitos do peixe *Danio rerio*.

¹Projeto: Desenvolvimento de modelos *in vitro* e *in vivo* geneticamente modificados como biomarcadores de qualidade ambiental (878615/2008).

²Estudante do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande; E-mail: reh.coimbra@yahoo.com.br.

³Docente do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-FURG).

Metodologia

Hepatócitos de *D. rerio* ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram expostos a concentração de 20 mg Cu/L (CuCl_2), mantidas à 28°C por 24h. Após, foi realizada a extração do RNA total e síntese do cDNA. Os testes de expressão gênica foram realizados por RT-PCR semi-quantitativa, utilizando *primers* específicos dos genes *gcl*, *gs*, *gr* e β -actina (normalizador).

Para a medição dos grupos sulfidril não-protéicos (NP-SH), protéico (P-SH) e totais (T-SH), foi utilizado o método de Sedlak & Lindsay (1968). O resultado foi expresso em mol GSH/mg de proteína. Os experimentos foram realizados utilizando-se no mínimo triplicata. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. A análise dos resultados foi realizada através do teste Anova one-way ($p < 0,05$), onde os pré-requisitos foram previamente testados.

Resultados e Discussão

Vários estudos têm relatado os efeitos tóxicos da exposição a metais em *D. rerio* (Griffitt et al., 2007). De acordo com Sandrini et al. (2009), o cobre acumula-se em seus hepatócitos, induzindo um aumento intracelular de EROs, sem mudança na capacidade antioxidante total. Porém, no presente estudo, o cobre induziu significativamente aumento da expressão dos genes *gcl* e *gs* (Fig. 1A). Este resultado é semelhante ao observado por Canesi et al. (1999) para a atividade enzimática de GCL em glândula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* expostos ao CuCl_2 . Porém, foi observada uma diminuição nos níveis de GSH nas células expostas ao cobre (Fig. 1B), o mesmo observado por Canesi et al. (1999) e por Ghosh et al. (2001) após exposição ao cobre de hepatócitos de *Heteropneustes fossilis*. Neste sentido, sabe-se que o cobre gera dano de DNA e em outros componentes celulares via estresse oxidativo (Sandrini et al., 2009) e, portanto, a GSH estaria sendo utilizada como um antioxidante, formando GSSG ou conjugando-se a compostos danificados.

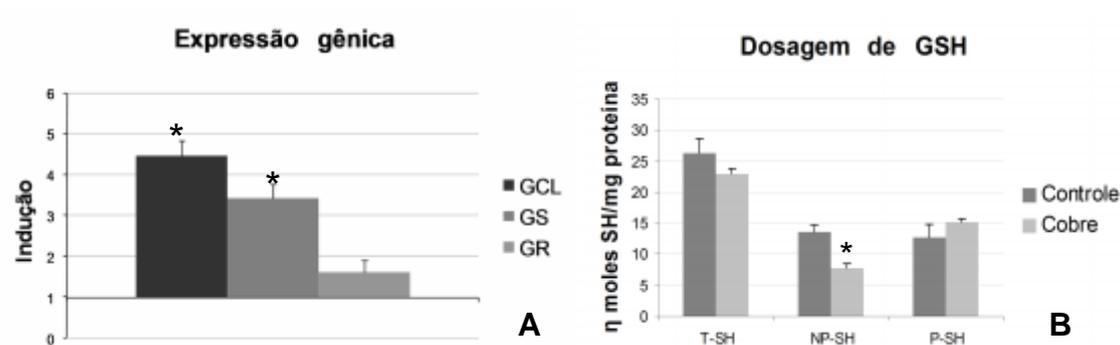


Figura 1: A – Expressão gênica; B – Dosagem de GSH.

Concluindo, a indução da expressão de *gcl* e *gs* sugere a ativação dos mecanismos de produção de GSH, porém seu amplo consumo faz com que seus níveis estejam reduzidos.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo financiamento do projeto (480015/2007-4) e pela bolsa BIC.

Referências

- BOPP, S.K. et al. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. **Aquat. Toxicol.** v.86, p.197-204, 2008.
- CANESI, L. et al. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquat. Toxicol.** v.46, p.67–76, 1999.
- DICKINSON, D.A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem. Pharmacol.** v.64, p.1019-1026, 2002.
- GHOSH, M.C. et al. Impact of copper on biomonitoring enzyme ethoxyresorufin-o-deethylase in cultured catfish hepatocytes. **Environ. Res. A**, v.86, p.167-173, 2001.
- GRIFFITT, R.J. et al. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). **Environ. Sci. Technol.** v.41, p.8178–8186, 2007.

ILES, K. E.; LIU, R. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. **Free Rad. Biol. Med.** v.38, p. 547-556, 2005.

SANDRINI, J.Z. et al. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. **Aquat. Toxicol.** doi:10.1016/j.aquatox.2009.02.016.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** v.25, p.192-205, 1968.