

## **AVALIANDO DIFERENÇAS RELACIONADAS AO SEXO NA RESPOSTA DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO PEIXE *Poecilia vivipara* EXPOSTO AO COBRE**

**TAINÁ GUILLANTE<sup>1</sup>; MAIDANA DA SILVA IDIARTE<sup>2</sup>; CÍNTIA MACEDO COSTA<sup>2</sup>;  
RICARDO BERTEAUX ROBALDO<sup>2</sup>; YURI DORNELLES ZEBRAL<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tainaguillante@gmail.com](mailto:tainaguillante@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [maydanaidiarte@gmail.com](mailto:maydanaidiarte@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Rio Grande – [yurizebral@gmail.com](mailto:yurizebral@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

A poluição aquática causada por ações antrópicas aumentou consideravelmente nos últimos anos, tornando cada vez mais necessário o uso de ferramentas para seu monitoramento. A avaliação dos riscos de impactos causados por contaminantes muitas vezes leva em consideração apenas variáveis químicas e físicas de amostras ambientais, não retratando os efeitos deletérios causados na biota (LAM e GRAY, 2003). Diante disso, ao avaliar a ação de contaminantes, torna-se necessário mensurar os efeitos que essas substâncias causam nos organismos, sendo útil o uso de biomarcadores. Sabe-se que estas ferramentas devem ser previamente testadas e ajustadas nos organismos alvo, e que a sensibilidade das espécies aos contaminantes pode variar de acordo com diversos fatores (BRIX et al., 2001), como por exemplo a idade, o estado de nutrição, o tamanho, a fase do desenvolvimento, as diferenças metabólicas, as interações interespecíficas, as características genéticas e o sexo.

Dentre esses poluentes ambientais, podemos citar o cobre (Cu), um metal essencial para os organismos, mas que em altas concentrações pode acumular e exercer toxicidade na biota aquática (MC GEER et al., 1999). Em excesso, este metal causa efeitos fisiológicos adversos em peixes, incluindo modificações em diversos parâmetros do estado oxidativo (MACHADO et al., 2013; ZEBRAL et al., 2019). O estresse oxidativo pode ser caracterizado como o desequilíbrio entre a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a concentração de defesas antioxidantes (MONSERRAT et al., 2007). Um efeito prejudicial é verificado quando ocorre aumento excessivo na produção de EROS, diminuição dos agentes antioxidantes (enzimáticos ou não enzimáticos) ou ambos. Essas alterações podem levar um organismo a sofrer danos oxidativos em lipídios, proteínas ou no DNA (LIVINGSTONE, 2003).

Embora muitos trabalhos recentes tenham estudado o uso de biomarcadores para a avaliação de impactos relacionados à contaminação ambiental, é notável que existam poucos estudos, tanto em laboratório como no campo, que tenham avaliado a forma como estes biomarcadores respondem em organismos de sexos opostos. Alguns estudos chegam a utilizar um desenho experimental com uma relação sexual igual, mas na hora de apresentar os resultados não analisam e também não relatam as possíveis diferenças entre os sexos. Somado a isto, uma vertente atual de pesquisadores entende que ensaios ecotoxicológicos devem começar a replicar a complexidade de fatores encontrados no ambiente, buscando entender, por exemplo, o papel da variabilidade intraespecífica (e.g sexo) na toxicidade dos contaminantes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do sexo na resposta de biomarcadores de estresse oxidativo no peixe *Poecilia vivipara* exposto ao cobre.

## 2. METODOLOGIA

### *Desenho experimental*

O experimento foi realizado com exemplares adultos de *P. vivipara* coletados na praia do Cassino (licença de coleta SISBio nº 44769) e aclimatados sob as mesmas condições: fotoperíodo 12L:12E, temperatura constante de 25°C, amônia < 0,1ppm, pH 7,5-8,0 e salinidade de 10 ppm. A exposição ao cobre ocorreu em triplicatas (5 fêmeas e 5 machos por repetição) totalizando 30 indivíduos por tratamento. Os animais foram submetidos a duas concentrações de cobre de relevância ambiental: 9 e 20µg/L mais o grupo controle. Durante a exposição, os animais não foram alimentados e houve renovação parcial do meio todos os dias, afim de manter níveis de cobre estáveis. Após as 96h de exposição, os animais foram eutanasiados com benzocaína (50ppm) e coletou-se fígado para determinação da Capacidade Antioxidante Total (TAC) e peroxidação lipídica (LPO), avaliada pelo método do TBARS.

### *Determinação TAC e TBARS*

A TAC foi avaliada em amostras de fígado de *P. vivipara* usando o "Kit de Ensaio de Capacidade Antioxidante Total OxiSelect™ (TAC)". As leituras de absorbância foram realizadas em um leitor de microplacas e os dados normalizados pelo teor de proteína total dos homogeneizados das amostras e expressos como equivalentes redutores de cobre mM / mg de proteína total.

O dano oxidativo, medido como LPO, foi avaliado de acordo com o método fluorimétrico descrito por Van Der Kraak (2003). A fluorescência produzida pela reação do método foi medida utilizando um fluorímetro. A concentração de TBARS foi calculada utilizando uma curva padrão construída com tetrametoxipropano e os dados foram normalizados pela proteína total do homogeneizado e expressos em nmol MDA/mg de proteína.

### *Análise estatística*

Os dados são expressos como média ± erro padrão e foram submetidos à análise de covariância (ANCOVA) com dois fatores (concentração de cobre e o sexo) e o peso dos indivíduos utilizado como covariável. Posteriormente realizou-se o teste *post-hoc* de Fisher. As diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final das 96h de exposição, uma interação significativa foi observada entre a concentração de cobre e o sexo para os níveis de peroxidação lipídica (LPO) no fígado. O sexo influenciou nos níveis de LPO hepático em peixes expostos a 9µg/L de cobre, neste caso, os machos apresentaram níveis mais elevados desse parâmetro quando comparados com as fêmeas (Fig. 1A). Além disso, para os machos verificou-se um dano oxidativo maior na concentração de 9µg/L em relação ao grupo controle.

Diferentemente, o sexo e a exposição ao cobre não afetaram os níveis de TAC no fígado e nenhuma interação significativa foi observada (Fig. 1B).

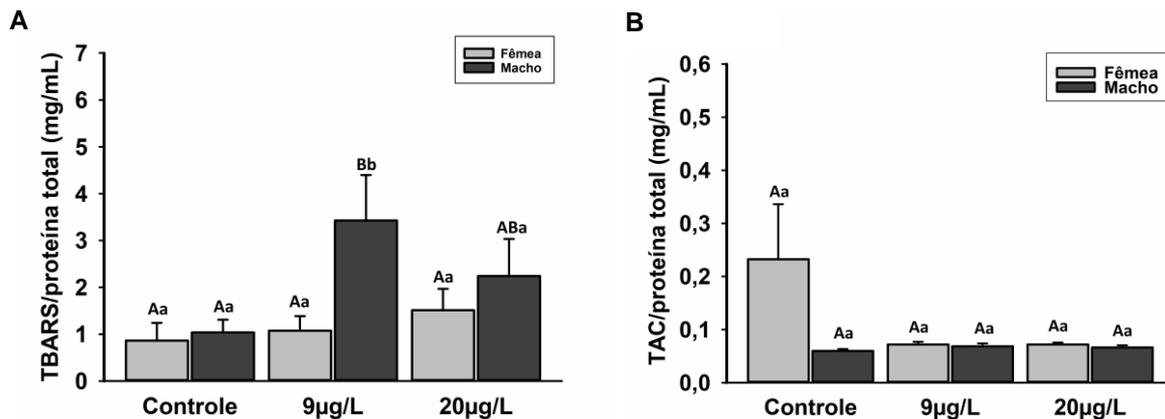


Figura 1: (A) Peroxidação lipídica (LPO) e (B) Capacidade antioxidante total (TAC) no fígado de fêmeas e machos do peixe *Poecilia vivipara* exposto ao cobre por 96h. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre as concentrações de cobre dentro de cada sexo. Letras minúsculas significam diferenças entre os sexos dentro de cada tratamento (ANCOVA;  $p < 0,05$ ;  $n \geq 7$ )

O aumento nos níveis de LPO observado em nosso estudo para os machos expostos a 9µg/L pode estar relacionado a atividade do citocromo P450. O citocromo P450 abrange uma superfamília de enzimas (famílias CYP1, 2, 3 e 4) importantes na biotransformação de poluentes ambientais (NEBERT E DALTON, 2006). A exposição a contaminantes pode induzir um aumento na atividade dessas enzimas e assim contribuir para níveis mais elevados de ERO's (VAN DER OOST et al., 2003). Somado a isto, alguns estudos apontam que a atividade destas enzimas, ou até mesmo as vias de biotransformação utilizadas, podem ser diferentes entre fêmeas e machos, indicando que a resposta ao estresse oxidativo pode variar entre animais de sexos opostos (WINZER et al, 2001; WINZER et al, 2002). Vega-López et al (2007) mostraram que a atividade da CYP1A foi aumentada em peixes *Girardinichthys viviparus* machos expostos a PCB's em relação as fêmeas. Além disso, para essa espécie os níveis basais da atividade de CYP1A são mais elevados nos peixes machos (VEGA-LÓPEZ et al., 2007).

Neste ponto é interessante destacar que, apesar de ter sido possível observar aumento de dano oxidativo no fígado dos animais expostos a 9µg/L de Cu, este mesmo efeito não foi observado nos animais expostos a maior concentração deste metal. Este interessante resultado é um indício de que a exposição a uma concentração medianamente alta de Cu pode ser mais prejudicial do que a exposição a uma concentração bem mais alta. A lógica por trás deste evento pode estar baseada nos mecanismos de ativação dos sistemas de defesa antioxidantes. É possível que a maior concentração de Cu testada neste trabalho seja mais eficiente em ativar tais mecanismos, causando, então, uma resposta defensiva mais intensa, explicando a ausência de elevação de LPO. No entanto, nossos resultados não demonstram diferenças para TAC, o que pode ser explicado pelo fato deste biomarcador levar em consideração principalmente as defesas antioxidantes do sistema não enzimático, não avaliando as defesas antioxidantes enzimáticas. Portanto, o sistema de defesa antioxidante enzimático pode ter sido ativado com maior intensidade nos animais expostos à maior concentração de Cu. De fato, Machado et al (2013) demonstrou um aumento na enzima catalase (CAT) para a concentração de 20µg/L em relação a concentrações mais baixas deste metal.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, concluímos que existem diferenças relacionadas ao sexo no dano oxidativo hepático do peixe *Poecilia vivipara* exposto ao cobre. Os peixes machos mostraram-se mais impactados pela exposição a este metal, mas o efeito observado não foi linear com o aumento das concentrações de Cu. Além disto, o dano oxidativo observado para a concentração de 9µg/L de Cu não foi acompanhado por alterações na TAC.

Por fim, o conhecimento dos efeitos do sexo na resposta de biomarcadores no peixe *P. vivipara* auxilia para que sejam desenvolvidos ensaios ecotoxicológicos mais eficientes e confiáveis, além de fornecer dados para atualização e criação de novas políticas de conservação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LAM, P.K.S.; GAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution**, v.46, p. 182-186, 2003.
- LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656–666. 2001.
- MACHADO, A. A. S.; HOFF, M. L. M.; KLEIN, R. D.; CARDOZO, J. G.; GIACOMIN, M. M.; PINHO, G. L. L.; BIANCHINI, A. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. **Aquatic Toxicology**, v. 138–139, n. 15, p. 60-69, 2013.
- MCGEER, J.C.; SZEBEDINSKY, C.; MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Ionoregulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, v.50, p. 231-243, 2000.
- MONSERRAT, J.M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.146, p. 221–234, 2007.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p. 57-149, 2003.
- VEGA-LÓPEZ, A.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; JIMÉNEZ-OROZCO, F.A.; GARCÍA-LATORRE, E.; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, M. L. Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, part A 146 672–678, 2007.
- VEGA-LÓPEZ, A., MARTÍNEZ-TABCHE, L., GALAR-MARTÍNEZ, M. Toxic effects of waterborne exposure to polychlorinated biphenyls and sex-linked differences in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). **Environment International** v.33, p.4540-545, 2007.
- WINZER, K., WINSTON, G.W., BECKER, W., VAN NOORDEN, C.J.F., KÖEHLER, A. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L). **Aquatic Toxicology**, 52, 143–155, 2001.
- WINZER, K., VAN NOORDEN, C.J.F., KÖEHLER, A. Sex-specific biotransformation and detoxification after xenobiotic exposure of primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L). **Aquatic Toxicology**, 59, 17–33, 2002.
- ZEBRAL, Y.D. et al. Waterborne copper is more toxic to the killifish *Poecilia vivipara* in elevated temperatures: linking oxidative stress in the liver with reduced organismal thermal performance. **Aquatic Toxicology**, v. 209, p. 142-149, 2019.