



SETAC – Brazil

Mutagenicidade do Sedimento e Estresse Oxidativo Hepático em Peixes sob a Influência de Curtumes

K. C. TAGLIARI,^{1,2} R. CECCHINI,³ J. A. VAZ ROCHA¹ & V. M. F. VARGAS^{1,2*}

¹FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler, Programa de Pesquisas Ambientais, Av. Dr. Salvador França, 1707, CEP 90690-000, Porto Alegre, RS

²PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS

³UEL – Universidade Estadual de Londrina, Depto. de Ciências Patológicas, C.P. 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR

RESUMO

A mutagenicidade da água intersticial e a de extratos orgânicos do sedimento dos rios Cadeia e Feitoria foram avaliadas através do ensaio de microssuspensão em *Salmonella* utilizando as cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102, na ausência e presença de S9 mix. No local contaminado, as respostas para água intersticial foram mutagênicas ou indicativas dessa atividade, sugerindo presença de compostos mutagênicos causadores de substituição de pares de base e erros no quadro de leitura do DNA das linhagens estudadas, incluindo substâncias que geram estresse oxidativo. Os extratos orgânicos estudados apresentaram mutagênese direta ou indicativa em relação às linhagens TA97a, TA98 e TA100. De modo geral, a fração metabólica exógena diminuiu a mutagenicidade das amostras. Os fígados de *Gymnogeophagus gymnogenys*, família *Cichlidae*, coletados na área impactada, comparados aos do local não poluído, foram analisados quanto aos parâmetros de estresse oxidativo. Comparativamente aos controles, houve aumento significativo na atividade da superóxido dismutase (SOD), nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e na quimiluminescência das células hepáticas dos peixes da área poluída. A concentração dos citocromos P450 e b5 diminuiu significativamente nos peixes do local poluído em relação ao local de referência, enquanto a atividade da catalase não sofreu alteração. Foi possível correlacionar as alterações biológicas sofridas nos peixes expostos aos despejos de curtumes com a presença de compostos mutagênicos na água intersticial desse ambiente.

Palavras-chave: ensaio de microssuspensão em *Salmonella*, cromo, compostos orgânicos, sedimento, estresse oxidativo em peixes.

ABSTRACT

Sediment mutagenicity and liver oxidative stress in fish under tannery influence

The mutagenicity of interstitial water and organic extracts from the sediments in the Cadeia and Feitoria Rivers, RS, Brazil, were evaluated by *Salmonella* microsuspension bioassay using TA97a, TA98, TA100 and TA102 strains, in the absence and presence of S9 mix. At the contaminated site, the mutagenic responses for interstitial water, suggested the presence of frameshift and base pair substitution mutagens, including substances that generate oxidative stress. Organic extracts presented direct or indicative mutagenesis to the TA97a, TA98 and TA100 strains. In general, an exogenous metabolic systems decreased the mutagenicity of the samples. The livers of *Gymnogeophagus gymnogenys*, family *Cichlidae*, collected in this impacted area, compared to a non-polluted site, were analyzed for oxidative stress parameters. Compared to the controls, there was a significant increase in the activity of superoxide dismutase (SOD), levels of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), and in the chemiluminescence of hepatic cells in fish collected at the polluted area. The concentration of cytochromes P450 and b5 decreased drastically in the fish at the polluted site, while the catalase activity did not change. It was possible to correlate the biological changes in the fish with the presence of mutagenic compounds in interstitial water in this area.

Key words: *Salmonella* microsuspension bioassay, chromium, organic compounds, sediment, oxidative stress in fish.

*Corresponding author: Vera Maria Ferrão Vargas, e-mail: vvargas@brturbo.com.

INTRODUÇÃO

Compostos químicos provenientes de atividades antrópicas industriais, agrícolas e domésticas, quando liberados no ambiente sem tratamento adequado, constituem risco potencial para a saúde humana e a integridade dos ecossistemas. Atualmente, entre os testes de mutagenicidade mais utilizados em amostras ambientais estão os que usam microrganismos, em especial o teste *Salmonella*/microssoma (teste de Ames). O ensaio de microssuspensão em *Salmonella*, uma modificação do teste de Ames clássico, é sensível na detecção de mutagenicidade em diversos tipos de amostras. Além disso, esse ensaio permite a utilização de pequenas quantidades de amostras, de frações metabólicas hepáticas e de seus co-fatores, fatores importantes em estudos ambientais (Maron & Ames, 1983; Kado et al., 1983; Vargas et al., 1995). Os estudos de estresse oxidativo hepático em animais aquáticos fornecem parâmetros para biomonitoramento ambiental (DiGiulio et al., 1989; Bainy et al., 1996).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

As amostras de sedimento foram coletadas no inverno de 2000 e no verão de 2002, em dois arroios localizados no nordeste do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). Um ponto de amostragem escolhido, Arroio Feitoria – FEI001 (Figura 1), localiza-se nas proximidades de indústrias de curtume, além de estar sob influência agrícola e de esgotos domésticos em menor escala. O outro ponto, Arroio Cadeia – CAD006 (Figura 1), encontra-se em local considerado de referência, sem interferência de esgotos domésticos e industriais.

Os peixes foram coletados em abril, maio, julho e agosto de 2002, no Arroio Feitoria e na Lagoa Fortaleza (Figura 1), sendo a espécie *Gymnogeophagus gymnogenys*, família *Cichlidae*, escolhida por fornecer quantidade de fígado suficiente para as análises e por se alimentar frequentemente no substrato do rio.

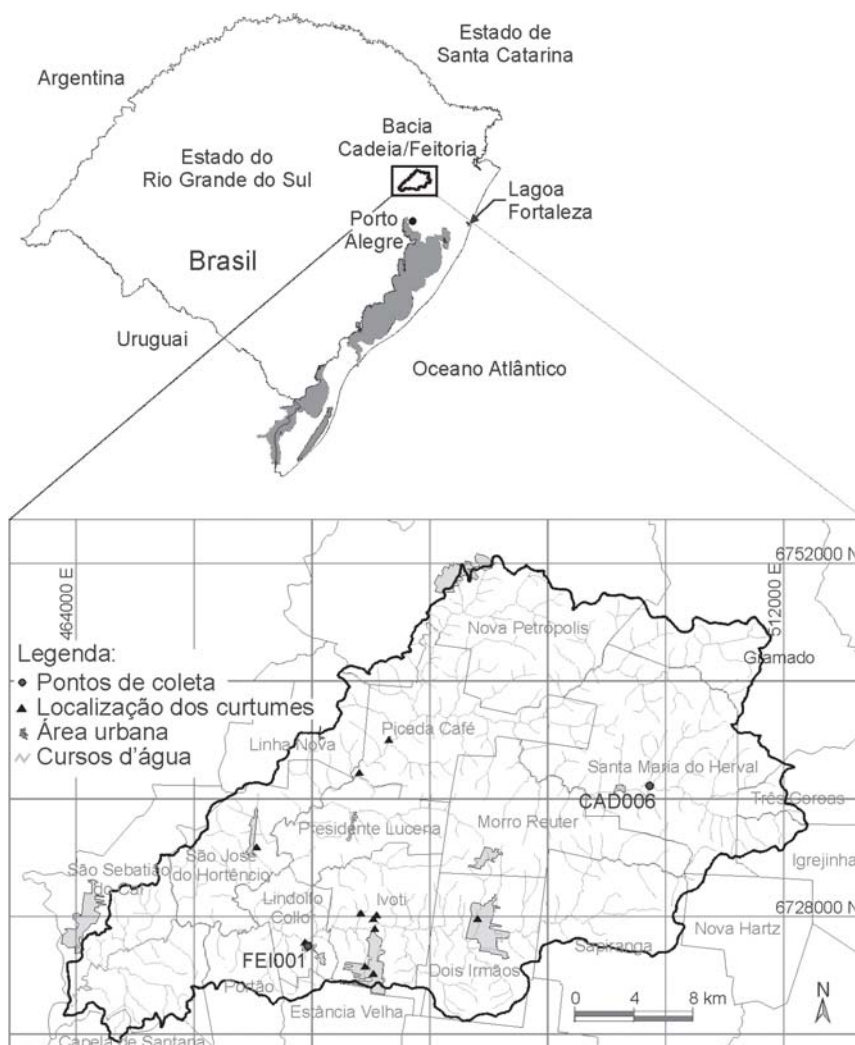


Figura 1 — Área de estudo com localização dos pontos de amostragem.

Extrações e ensaios

A água intersticial foi extraída das amostras de sedimento através de centrifugação a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Os extratos orgânicos das amostras de sedimento foram obtidos através de extração química, pela técnica de ultra-som com concentração em rota-vapor, utilizando o solvente diclorometano grau pesticida para extrair a fração moderadamente polar. As avaliações de mutagênese e citotoxicidade foram realizadas através do ensaio de microssuspensão em *Salmonella* (Kado *et al.*, 1983), nos volumes de 50, 100, 150, 200, 300 e 400 µl/placa para água intersticial e de 2,5, 10, 40 e 80 µg/placa para os extratos orgânicos. Os ensaios foram realizados com as cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, para as amostras de água intersticial, e com TA97a, TA98 e TA100, para as amostras de extratos do inverno, em presença e ausência de ativação metabólica (fração S9 de fígado de rato).

A amostra foi considerada positiva quando o valor da mutação induzida foi o dobro da atividade mutagênica observada no controle negativo e quando houve relação significativa na curva dose-resposta avaliada pelo programa SALMONEL (Myers *et al.*, 1991). Quando somente um dos critérios citados foi observado, a amostra foi considerada como indicativa de atividade mutagênica. No teste de viabilidade celular, as respostas foram consideradas citotóxicas quando a porcentagem de sobrevivência na amostra foi menor que 60% da observada no controle negativo.

Os fígados dos peixes capturados foram extraídos e armazenados como "pool" em nitrogênio líquido até o momento dos ensaios. A obtenção da fração microssomal hepática, utilizada na determinação espectral dos citocromos P450 e b5 (Omura & Sato, 1964) e da fração sobrenadante, usada na avaliação das atividades da superóxido dismutase – SOD (Marklund & Marklund, 1974) e da catalase – CAT (Aebi,

1984), foi realizada através de centrifugações sequenciais (Cecchini *et al.*, 1990). A quimiluminescência (Flecha *et al.*, 1991) e a lipoperoxidação hepáticas (Oliveira & Cecchini, 2000) também foram incluídas na avaliação do estresse oxidativo do *G. gymnogynys*. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste-t de Student através de programa computadorizado (GraphPad InStat, GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras de água intersticial do FEI001, foi observada mutagenicidade significativa (Renque 2) tanto no inverno como no verão para as linhagens TA98, TA100 e TA102, em ensaios diretos (Figura 2). As respostas foram negativas (Renque 0) para TA97a, sem e com S9mix. As amostras de verão do CAD006 apresentaram indícios de mutagenicidade (Renque 1), utilizando a TA102, na ausência e presença de S9mix. Quanto aos extratos orgânicos (Figura 3), as amostras de inverno do FEI001 apresentaram mutagenicidade positiva (Renque 2) para a linhagem TA97a e indícios dessa atividade nas linhagens TA98 e TA100 (Renque 1), em ensaios diretos. Após utilização de metabolismo exógeno, a mutagenicidade da maioria das amostras foi diminuída. Nenhuma das amostras apresentou citotoxicidade com ambos os tratamentos.

Comparativamente aos controles (Lagoa Fortaleza), houve aumento significativo na atividade da SOD, da lipoperoxidação detectada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e na quimiluminescência das células hepáticas de *G. gymnogynys* coletados no FEI001 (Tabela 1). Além disso, houve drástico decréscimo na concentração dos citocromos P450 e b5 nos peixes do local poluído em relação à área controle, enquanto não houve alteração significativa na atividade da catalase.

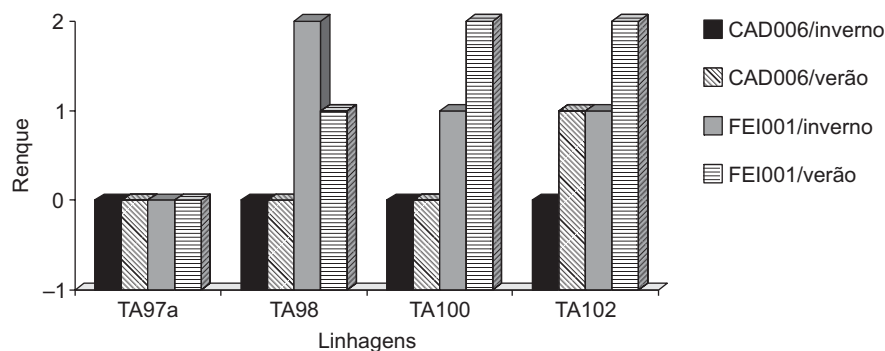


Figura 2 — Renque de mutagenicidade direta das amostras de água intersticial dos Arroios Cadeia e Feitoria, no inverno e verão. Renque de mutagenicidade baseado na mutação induzida e na curva dose-resposta (revertentes/µl de água intersticial) avaliadas pelo programa SALMONEL (Myers *et al.*, 1991), em que Renque 0 = sem mutagenicidade; Renque 1 = indícios de mutagenicidade; Renque 2 = mutagenicidade significativa.

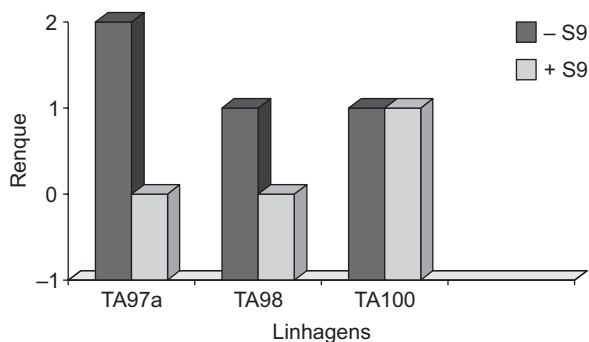


Figura 3 — Renque de mutagenicidade das amostras de inverno de extratos orgânicos do Arroio Feitoria, na ausência (– S9) e presença (+ S9) de metabolismo exógeno. Renque de mutagenicidade baseado na mutação induzida e na curva dose-resposta (revertentes/ μ g de extrato orgânico) avaliadas pelo programa SALMONEL (Myers *et al.*, 1991), em que Renque 0 = sem mutagenicidade; Renque 1 = indícios de mutagenicidade; Renque 2 = mutagenicidade significativa.

Tabela 1 — Parâmetros avaliados no fígado de peixes (*Gymnogeophagus gymnogenys*) coletados na Lagoa Fortaleza, Cidreira, RS, e no Rio Feitoria, Lindolfo Collor, RS.

| Parâmetros ^a | Media \pm s.d. ^b | | Análises estatísticas (p) ^c |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------|--|
| | Lagoa | Rio | |
| CITOCROMO P450 (nmol/mg proteína) | 0,22 \pm 0,056 | N.D. | – |
| CITOCROMO b5 (nmol/mg proteína) | 0,32 \pm 0,027 | 0,17 \pm 0,080 | 0,037 |
| CATALASE (\neq ABS/mg proteína) | 7,84 \pm 0,481 | 8,77 \pm 0,007 | 0,224 |
| SUPERÓXIDO DISMUTASE (U/mg proteína) | 38,50 \pm 0,810 | 74,75 \pm 2,40 | 0,002 |
| TBARS (nmol TBARS/mg proteína) | 0,37 \pm 0,150 | 0,79 \pm 0,348 | 0,035 |
| QL (máxima cpm/mg proteína) | 95255 \pm 24596 | 164244 \pm 21609 | < 0,0001 |

^aOs citocromos P450 e b5 foram expressos em nmol por mg de proteína; a catalase, como diferença de absorvância (\neq ABS) por mg de proteína; a SOD, como unidades (U) por mg de proteína; TBARS, como nmol de TBARS por mg de proteína; e a quimiluminescência, como cintilações por minuto por mg de proteína.

^bLagoa Fortaleza (pool = 41 animais); rio Feitoria (pool = 60 animais). Para cada parâmetro foram realizadas 6 repetições e, portanto, o SD está relacionado à metodologia de repetição.

^cTeste t de Student não pareado; quando os SDs das médias foram diferentes, foi aplicado o teste alternativo de Welch. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05$.

A mutagenicidade ou seus indícios em amostras de água intersticial e extrato orgânico, nas cepas avaliadas, demonstra a presença de substâncias capazes de modificar o deslocamento do quadro de leitura e de substituir pares de bases no DNA, incluindo compostos oxidantes detectados pela TA102. As amostras de água intersticial do FEI001 mostraram atividade mutagênica ou indícios dessa ação de forma mais acentuada

sem ativação metabólica, com diminuição da mutagenicidade após o uso de S9mix. Em estudos com metais pesados, principalmente na avaliação de cromo hexavalente, foram encontrados resultados semelhantes (Bianchi *et al.*, 1983; DeFlora *et al.*, 1984), sugerindo a presença desse metal na água intersticial do FEI001. Entretanto, a mutagenicidade encontrada nos extratos orgânicos do FEI001 sugere contribuição de com-

postos mutagênicos de natureza moderadamente polar como os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs). A detecção da mutagenicidade no FEI001 indica os riscos biológicos a que a flora e a fauna estão expostas nesse ecossistema. Utilizando *G. gymnogenys* como biomarcadores de poluição aquática foi possível verificar que os animais do FEI001 (área poluída), em relação aos animais do local de referência, estão sofrendo estresse oxidativo hepático de forma semelhante aos resultados encontrados em peixes inoculados com dicromato de potássio (Tagliari *et al.*, 2004). Essas evidências concordam com o diagnóstico de mutagenicidade na água intersticial do FEI001 e indicam a presença de compostos oxidativos como o cromo no local. Esses resultados indicam a complexidade de substâncias reativas presentes em uma amostra ambiental e permitem ações preventivas e mitigadoras.

Agradecimentos — Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Dr. Luiz Roberto Malabarba, aos Mestres Getúlio Dornelles e Rubem C. Horn, a Eliana C. Sarmento e Lílian W. Ferraro, à equipe de coleta da FEPAM, aos técnicos da UEL e ao Prof. Bruce N. Ames. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul e Financiadora de Estudos e Projetos (PADCT/FINEP, no. 77.97.1116.00) e apoiado pela FEPAM e PUCRS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H., 1984, Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, 105: 121-126.
- BAINY, A. C. D., SAITO, E., CARVALHO, P. S. M. & JUNQUEIRA, V. B. C., 1996, Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.*, 34: 151-162.
- BIANCHI, V., CELOTTI, L., LANFRANCHI, G., MAJONE, F., MARIN, G., MONTALDI, A., SPONZA, G., TAMINO, G., VENIER, P., ZANTEDESCHI, A. & LEVIS, A. G., 1983, Genetic effects of chromium compounds. *Mutat. Res.*, 117: 279-300.
- CECCHINI, R., ARUOMA, O. I. & HALLIWELL, B., 1990, The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes, liposomes or from DNA damage by bleomycin or phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Radical Res. Comms.*, 10: 245-258.
- DE FLORA, S., ZANACCHI, P., CAMOIRANO, A., BENNICELLI, C. & BADOLATI, G. S., 1984, Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutat. Res.*, 133: 161-198.
- DI GIULIO, R. T., WASHBURN, P. C., WENNING, R. J., WINSTON, G. W. & JEWELL, C. S., 1989, Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 1103-1123.
- FLECHA, B. G., LLESUY, S. & BOVERIS, A., 1991, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.*, 10: 93-100.
- KADO, N. Y., LANGLEY, D. & EISENSTADT, E., 1983, A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.*, 121: 25-32.
- MARKLUND, S. & MARKLUND, G., 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47: 469-474.
- MARON, D. M. & AMES, B. N., 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215.
- MYERS, L. N., ADAMS, L., KIER, T. K., RAO, B., SHAW, B. & WILLIAMS, L., 1991, Microcomputer software for data management and statistical analyses of the Ames/*Salmonella* test. In: D. Krewski (ed.), *Statistical methods in toxicological research*. Gordon and Brech, New York.
- OLIVEIRA, F. J. de A. & CECCHINI, R., 2000, Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *J. Parasitol.*, 86: 1067-1072.
- OMURA, T. & SATO, R., 1964, The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239: 2370-2378.
- TAGLIARI, K. C., VARGAS, V. M. F., ZIMIANI, K. & CECCHINI, R., 2004, Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 17: 149-157.
- VARGAS, V. M. F., GUIDOBONO, R. R., JORDÃO, C. & HENRIQUES, J. A. P., 1995, Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutat. Res.*, 343: 31-52.

