Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Artur Pedro do Carmo Moes

Atividade de Glutationa Peroxidase em frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

Rio de Janeiro

2010

Artur Pedro do Carmo Moes

Atividade de Glutationa Peroxidase em frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M693 Moes, Artur Pedro do Carmo.
Atividade de Glutationa Peroxidase em frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887). / Artur Pedro do Carmo Moes. – 2010.
47 f.

Orientador: Jayme da Cunha Bastos Neto

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Estresse oxidativo - Teses. 2. Enzimas - Teses. 3. Pacu (Peixe) – Teses. 4. Espécies de Oxigênio Reativas. 5. Glutationa Peroxidase. I. Bastos Neto, Jayme da Cunha. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título

CDU 597.554.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Artur Pedro do Carmo Moes

Atividade de Glutationa Peroxidase em frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2010.

Orientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Jacyara Maria Brito Macedo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Márcia Cristina Paes

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos.

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, pelo apoio, incentivo e respeito às minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge e Isa Moes, por permanecerem ao meu lado, pelo suporte que nunca faltou e pelo amor incondicional. Devo tudo, literalmente tudo a vocês.

Ao Renato Mariz, meu companheiro, que divide comigo os momentos de felicidade e tristeza, de tolerância e preconceito. Te amo demais.

As minhas irmãs Silvânia e Alexandra, que me cederam por vezes suas casas, quando eu não tinha a minha, e compartilharam dos meus momentos.

Aos professores Jayme e Vera por me acolherem no laboratório, estarem sempre disponíveis e atuarem como verdadeiros orientadores. São meus exemplos.

A "tia Claudinha", que passou de uma professora excepcional da graduação a uma amiga para toda a vida, sem a qual eu não teria chegado aqui.

Ao Manildo que, de professor, foi a amigo, que me trouxe para a UERJ e que me fez crer que era possível — e ainda mais; que eu era capaz.

Ao Rafael Dantas, que me esclareceu o tema, que me ensinou as técnicas e me orientou nos experimentos.

Aos professores Lin e Roosevelt pelo companheirismo, pela ajuda nos experimentos e pelo suporte técnico indispensável.

Aos colegas de laboratório como um todo, Aline, Dudu, Frederico, Santiago, Laís, Rafael, Bruna, Carlucio e Daphne, pelos momentos de descontração e reflexão que tornaram a rotina em momentos de prazer e satisfação.

A tia Edna e a D. Iara, que me ajudaram em todos esses anos, em nome do meu querido avô Alfredo, que infelizmente não pode acompanhar o meu progresso, mas do qual reservo belas lembranças.

Ao pessoal do Departamento de Bioquímica, em especial ao Paulinho por sua ajuda constante (e por seus biscoitos salvadores na hora da fome).

A todos que esqueci de citar nesta lista.

Aos animais sacrificados para o êxito deste trabalho.

Coisas são semelhantes, por isso a ciência é possível. Coisas são diferentes, por isso a ciência é necessária.

Richard Lewontin

RESUMO

MOES, Artur Pedro do Carmo. *Atividade de Glutationa Peroxidase em frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887).* 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Íon superóxido ($O_2^{\circ-}$), radical hidroxila (.OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), três tipos de espécies reativas de oxigênio (ERO), tendem a aumentar nas células quando ocorre redução da tensão de oxigênio ou quando ocorre isquemia seguida de reperfusão. Se as quantidades destas espécies químicas altamente reativas não forem mantidas abaixo de certo limite, acontece o estresse oxidante, que impedirá o correto funcionamento bioquímico de macromoléculas, podendo sobrevir morte celular. As ERO têm sido alvo de diversos estudos porque participam em processos patológicos de grande importância, como o da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson. O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), é um peixe constantemente submetido na natureza a processos de hipoxia e reoxigenação, por isto deve ter adaptações morfológicas e bioquímicas que lhe permitem resistir a grandes mudanças nas concentrações de ERO. Falta ainda conhecer as enzimas antioxidantes capazes de proteger as células do pacu do estresse oxidante. As glutationa peroxidases (GPX) são enzimas que reduzem ERO como o H_2O_2 e os peróxidos de ácidos graxos. Sua atividade já foi descrita em frações citosólicas e ancorada à membrana de mitocôndrias e de microssomos de hepatócitos de ratos. Neste trabalho ensaiamos a atividade de glutationa peroxidase das frações mitocondriais e microssomais obtidas de fígado de pacu e determinamos algumas de suas propriedades cinéticas. Há mais atividade de GPX na fração microssomal do que na mitocondrial em células do fígado de pacu. Os resultados denotam a existência de alta atividade de glutationa peroxidase nas frações microssomais e mitocondriais hepáticas de pacu; maiores que as já descritas nas mesmas frações de hepatócitos de rato, indicando que num animal adaptado à hipoxia a atividade da GPX possa ser constitutivamente alta. O comportamento enzimático evidencia-se sigmoide. Maiores níveis de GSH interferem na catálise, aumentando a velocidade. A variação nos valores da velocidade frente as diferentes concentrações da GSH, mostram que o acréscimo nas concentrações da GSH aumenta a afinidade da GPX pelo H_2O_2, atingindo uma maior eficácia sobre H_2O_2 com concentrações entre 4 e 8 mM de GSH.

Palavras-chave: Enzimas. Estresse Oxidante. ERO. GPX.

ABSTRACT

MOES, Artur Pedro do Carmo. *Glutathione peroxidase activity in liver mitochondrial and microsomal fractions of pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887).* 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Superoxide ions ($O_2^{\cdot -}$), hydroxyl radicals ($^{\cdot}OH$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are three kinds of reactive of oxygen species (ROS) that tend to increase in cells under reduction of oxygen concentration or in cases of ischemia followed by reperfusion. If the quantities of these highly reactive chemical species are not kept bellow certain limits, the oxidative stress occurs, which leads to an impairment of the correct biochemical macromolecules functioning. This might end up with cellular death. ROS have been a target for several studies because they participate in pathologic processes of great importance, such as Alzheimer and Parkinson diseases. The pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), is a fish that is constantly submitted to hypoxia, so that it developed morphological and biochemical adaptations that permit it to resist to large changes of oxygen availability. However, it is still necessary to know the antioxidant enzymes that might be able to protect pacu cells against the oxidative stress. Glutathione peroxidases (GPX) are enzymes that reduce ROS as H_2O_2 and fatty acid peroxides. GPX activity from liver of rats has been described in three fractions: in citosol, anchored to the mitochondria membrane and associated to microsomes. Our objective was to assay glutathione peroxidase activity of the mitochondrial and microsomal hepatic fractions from pacu and determine some of its kinetic properties. There is more activity of GPX in microsomes than in mitochondria of pacu liver. The results show the existence of a very high activity of glutathione peroxidase in microsomal and mitochondrial hepatic fractions from pacu; higher than the ones already described in the same fractions from rat. This might be an indication that in an animal adapted to hypoxia the activity of GPX may be constitutively high. Enzymatic behavior is sigmoidal, and higher levels of GSH favors an increase of the maximum velocity of H_2O_2 reduction. The variation of velocity values in different concentrations of GSH shows that the increase in the concentrations of GSH favors the affinity of GPX by H_2O_2, and that the enzyme is most effective for reducing H_2O_2 at concentrations between 4 and 8 mM GSH.

Keywords: Enzyme. Oxidative stress. ROS. GPX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Complexo do Pantanal..... 12

Figura 2 – Lagos formados pelo pulso de inundação anual..... 13

Figura 3 – Pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887)..... 15

Figura 4 – Etapas de redução do O_2..... 17

Figura 5 – Peroxidação lipídica..... 18

Figura 6 – Reação catalisada pela SOD..... 20

Figura 7 – Reação catalisada pela catalase..... 21

Figura 8 – Atividade de GPX e a reação acoplada da glutationa redutase..... 28

Figura 9 – Efeito da concentração de GSH sobre a atividade GPX..... 31

Figura 10 – Atividade de GPX sobre diversas concentrações de H_2O_2 e GSH na fração microssomal hepática de pacu..... 32

Figura 11 – Atividade de GPX sobre diversas concentrações de H_2O_2 e GSH na fração mitocondrial hepática de pacu..... 33

Figura 12 - Comparação entre as atividades de GPX das frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu..... 34

Figura 13 – Comparação entre as atividades de GPX das frações mitocondriais e microssomais hepáticas de camundongos SW..... 35

Figura 14 - Comparação entre a atividade de GPX da fração microssomal hepática de pacu e camundongo..... 36

Figura 15 - Comparação entre a atividade de GPX da fração mitocondrial hepática de pacu e camundongo..... 36

Figura 16 - Efeito da adição da fração mitocondrial hepática de pacu na atividade de GPX..... 37

Figura 17 – Atividade peroxidásica sobre diferentes concentrações de PCOOH e 8 mM de GSH em fração mitocondrial hepática de pacu..... 38

Figura 18 – Atividade de GPX sobre PCOOH (100 µM) nas frações microssomais e mitocondriais hepáticas de camundongo SW e pacu..... 38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA –	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
DTT –	Ditiotreitol
EDTA –	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO –	Espécies reativas de oxigênio
GPX –	Glutationa peroxidase
GPX-GI –	Glutationa peroxidase gastrintestinal
GR –	Glutationa redutase
GSH –	Glutationa na forma reduzida
GSSG –	Glutationa na forma oxidada
kDa –	Quilodalton
K_M –	Constante de Michaelis-Menten
NADP –	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH –	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
pGPX –	Glutationa peroxidase plasmática
PHGPx –	Glutationa peroxidase de hidroperóxido de fosfolipídio
POOH –	Hidroperóxido de fosfatidilcolina
ptn –	Proteína
RNA –	Ácido ribonucleico
ROOH –	Radical peróxido
SOD –	Superóxido dismutase
Vmáx –	Velocidade máxima

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	12
1.1	**Pantanal**	14
1.2	**Ambiente aquático e hipoxia**	14
1.3	**Pacu**	15
1.4	**Espécies reativas de oxigênio (ERO)**	16
1.5	**Antioxidantes**.	19
1.6	**Glutationa peroxidases**	21
2	**OBJETIVOS**	25
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	26
3.1	**Animais**	26
3.2	**Equipamentos**	26
3.3	**Reagentes**	26
3.4	**Preparo das frações hepáticas**	27
3.5	**Determinação de proteínas**.	27
3.6	**Ensaio da atividade de GPX sobre peróxido de hidrogênio**.	28
3.7	**Ensaio da atividade de GPX sobre hidroperóxido de fosfatidilcolina**.	29
3.7.1	Preparo do hidroperóxido de fosfatidilcolina.	29
3.8	**Gráficos e análises estatísticas**.	30
4	**RESULTADOS**	31
4.1	**Atividade sobre GSH**:	31
4.2	**Atividade sobre H_2O_2:**	32
4.3	**Atividade sobre PCOOH**:	37
5	**DISCUSSÃO**	39
	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43

INTRODUÇÃO

O estudo da bioquímica e do metabolismo envolvido nos processos vitais de peixes neotropicais é um passo fundamental para que possamos conhecer e conservar as espécies nativas. Embora sejam informações importantes, a literatura sobre a bioquímica de peixes ainda é muito escassa; tais informações nos ajudam a compreender as necessidades ambientais, e tolerância às adversidades de cada espécie, assim como pode nos ajudar a prever quais os resultados das ações antrópicas sobre tais animais.

O aumento no consumo de carne de peixe, e o consequente crescimento da aquicultura, demandam maiores pesquisas sobre como obter condições melhores de desenvolvimento e rendimento do pescado. Todos os estudos sobre a bioquímica, metabolismo e comportamento destes animais são de estrema valia para o produtor, que pode obter informações mais precisas e assim desenvolver melhoramentos no manejo da sua produção.

Entender as ferramentas bioquímicas que tornam estes animais resistentes aos danos causados pela hipoxia severa, comum nos ambientes nos quais estes animais evoluíram, pode ser fundamentalmente importante para que possamos compreender o mecanismo de ação de certas doenças humanas que envolvam o estresse oxidante, e a isquemia como elementos do processo patológico, tais como o Alzheimer, o Parkinson, ou o infarto. Estas comparações podem nos trazer informações sobre como poderíamos desenvolver ferramentas para resistir aos danos da hipoxia, e elucidar os motivos pelos quais algumas pessoas são mais ou menos resistentes ao desenvolvimento ou agravamento de certas condições patológicas.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Pantanal

O pantanal (Figura 1) é um bioma que constitui o ecossistema com a maior área úmida do planeta localizado ao sul do Mato Grosso e ao noroeste do Mato Grosso do Sul, se estendendo ao norte do Paraguai e ao leste da Bolívia, classificado pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) como sendo um patrimônio natural mundial e importante reserva da biosfera. O Pantanal apresenta grande biodiversidade (http://whc.unesco.org/pg.cfm?cid=31&id_site=999).

Figura 1 – Complexo do Pantanal

Fonte: NASA WorldWind

As características geológicas da área do Pantanal estão ligadas ao passado geológico do complexo sistema fluvial da América do Sul. As repetidas incursões e regressões de águas marinhas, a formação de calhas, grandes depósitos de sedimentos, mudanças no curso e fluxo dos rios ao longo de milhões de anos culminou na formação e drenagem de grandes paleolagos continentais, como o lago Pebas, o lago Santa Lúcia e o lago Petaca, onde hoje é o Complexo do Pantanal e uma parte da Amazônia. Tais eventos geológicos contribuíram para diversificação da ictiofauna do local, e a geologia remanescente dos lagos Petaca e Santa Lúcia é provavelmente o motivo pelos quais acontece hoje na Amazônia e no Pantanal o fenômeno típico chamado pulso de inundação anual, conhecido popularmente como "cheias e vazantes", que dá origem a grandes áreas de planícies alagadas na qual se formam lagos rasos (Figura 2) onde a grande biomassa de organismos presentes, com a temperatura alta, leva a outro fenômeno característico que é a frequente alteração da concentração de oxigênio dissolvido na água (Resende, http://www.riosvivos.org.br/canal.php?canal= 34&mat_id=3575; Val *et al*., 1998; Lundberg *et al*., 1998).

Figura 2 – Lagos formados pelo pulso de inundação anual

1.2 **Ambiente aquático e hipoxia**

A concentração de oxigênio dissolvido na água é um fator determinante na seleção dos organismos aquáticos em seus respectivos nichos ecológicos. Esta concentração depende da pressão de oxigênio atmosférico e, portanto, varia de acordo com a altitude. No entanto, outros fatores como a temperatura, salinidade, decomposição de matéria orgânica e a biomassa podem diminuir ou aumentar a disponibilidade de oxigênio dissolvido na água (Baldisserotto, 2002; Davis, 1975; Diana *et al*., 1997; Chippari *et al*., 2003; Matsuo e Val, 2003).

O nível de oxigênio ideal para os peixes é em torno de 5-6 mg/L, níveis próximos a 3 mg/L são considerados estressantes para a maioria dos peixes e valores menores que 2 mg/L geram a condição de hipoxia (Boyd e Tucker, 1992; Baldisserotto, 2002)

Um considerável número de espécies de peixes pode apresentar adaptações que os tornam aptos a sobreviverem nos ambientes de baixa concentração de oxigênio. É possível verificar, por exemplo, o espessamento do lábio do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em situação de hipoxia, similar ao que ocorre com o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). Outros peixes denotam uma respiração aquática superficial em resposta à progressiva hipoxia como em tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) e tilápia-do-congo, *Tilapia rendali* (Boulenger, 1897). Foi observada uma série de adaptações em curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837), como redução na taxa respiratória, diminuição da atividade locomotora, aumento da frequência respiratória e aumento na capacidade de transporte do oxigênio (Parma-de-Croux, 1995; Moraes *et al*., 1997; Sundin, 2000; Chapman, 2002).

1.3 **Pacu**

O *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), peixe serrasalmídeo vulgarmente conhecido como pacu (Figura 3), é um peixe neotropical da família Characidae, cujos principais representantes são as piranhas. São endêmicos da bacia do Paraná-Paraguai, que atravessa a planície do Pantanal. É uma das espécies de peixes com alto valor econômico mais cultivada no Brasil.

Figura 3 – Pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887)

Fonte: FishBase

O pacu é uma espécie migradora, que também habita ambientes temporários, tais como os lagos formados pelas cheias e vazantes do pantanal. Eles estão sujeitos, nos períodos do ano em que ficam em lagoas, à hipoxia e apresentam grande plasticidade em suas adaptações respiratórias, entre elas a respiração aérea superficial, por meio da qual retiram da camada superficial da lâmina d'água, onde ocorre a difusão passiva do oxigênio atmosférico, mais oxigênio. No pacu a respiração aérea superficial é favorecida por inchaço do lábio inferior, que permite aumento da porção de água que é direcionada para as brânquias (Severi *et al*., 2000).

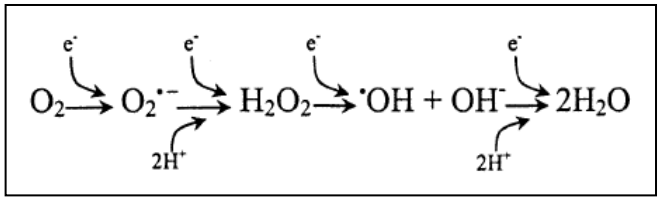
A respiração aérea superficial pode não resolver por completo o desafio oxidante ao qual as células do pacu estão submetidas nos exemplares sob hipoxia. Assim, as investigações sobre as adaptações bioquímicas intracelulares ao estresse oxidante que acontecem nos órgãos do pacu podem fornecer novas abordagens de investigação sobre os mecanismos de superação dos danos oxidantes em vertebrados submetidos a baixa concentração de oxigênio (Panepucci *et al*., 2001).

Existem muitas aplicações potenciais para o estudo do estresse causado por hipoxia em peixes. Por exemplo, os piscicultores precisam estabelecer melhores condições para o manejo dos peixes sob cultivo, assim como compreender as respostas dos peixes às mudanças de oxigênio que ocorrem constantemente nos tanques (Abreu *et al*., 2009).

1.4 **Espécies reativas de oxigênio (ERO)**

A manutenção do estado físico-químico organizado dos seres vivos requer energia. Para muitos organismos a energia é obtida da oxidação de substratos orgânicos pelo oxigênio molecular (O_2). Os dois átomos de oxigênio de cada molécula deste elemento são reduzidos completamente por quatro elétrons que são transportados ao longo da cadeia respiratória (Figura 4). Paralelamente, de 2 a 5% das moléculas de O_2 são reduzidas de forma univalente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, ocupando um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que outro continua desemparelhado, produzindo intermediários de oxigênio altamente reativos e instáveis denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Sorg, 2004; Schafer e Buettner, 2001; Covarrubias *et al.*, 2008).

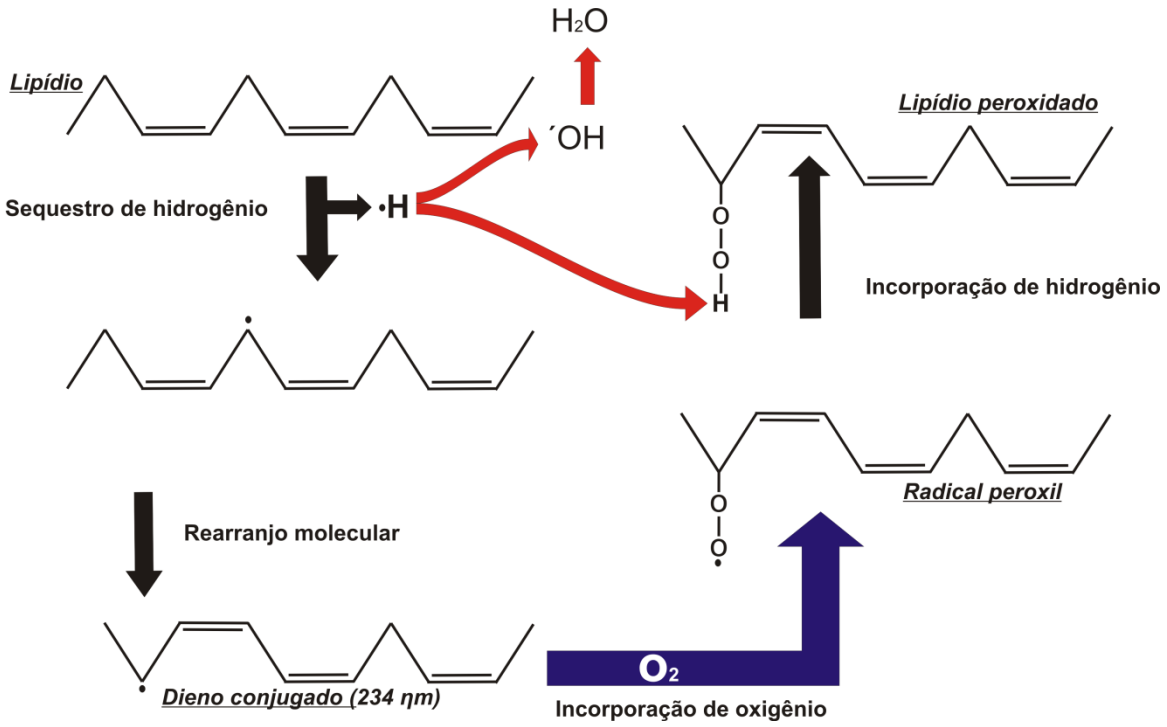
Figura 4 - Etapas de redução do O_2



As ERO, por apresentarem elétrons desemparelhados na sua estrutura, reagem avidamente com moléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídios, podendo alterar suas funções. O efeito final gerado depende não só do compartimento que está sendo afetado, mas do tipo de ERO que está reagindo. As ERO também apresentam papéis importantes em mecanismos fisiológicos, como na inflamação, na apoptose e no envelhecimento. Os três principais tipos de ERO são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) (Dröge, 2002).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o primeiro formado quando o oxigênio molecular adquire um elétron. Ele ocorre espontaneamente nas proximidades da membrana interna da mitocôndria onde se dá a cadeia respiratória. Possui período curto de vida dentro da célula e é utilizado como microbicida pelos leucócitos e fagócitos. O ânion superóxido age apenas no local onde foi produzido porque não atravessa membranas de forma eficiente. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas atravessa membranas, se distribui em outros locais fora daquele em que foi gerado e é extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o radical livre hidroxila ($^{\cdot}OH$). O radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) é formado em uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{++} ou Cu^+) conhecida como reação de Fenton, possui meia vida curta, reagindo rápida e indiscriminadamente com biomoléculas de todas as classes de quem sequestra um átomo de hidrogênio. Seus alvos podem ser ácidos nucleicos, nucleotídeos livres, proteínas e carboidratos, entretanto os ácidos graxos poli-insaturados de lipídios de membrana são os mais afetados. Inicialmente, o $^{\cdot}OH$ sequestra um átomo de hidrogênio do ácido graxo deixando-o com um elétron desemparelhado, isto favorece a ligação do O_2 que então rouba um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo (Figura 5), desta forma esse processo se propaga ao longo da membrana e termina com a quebra do lipídio peroxidado e o aparecimento de aldeído malônico e outros produtos (Covarrubias *et al.* 2008).

Figura 5 - Peroxidação lipídica



Três vertentes de estudo ressaltam o interesse biomédico das ERO: O postulado de que as ERO talvez sejam responsáveis pelos danos na hiperoxia, a formulação da teoria do envelhecimento causado por ERO e a descoberta da superóxido dismutase (SOD) e do seu papel fundamental contra as ERO removendo o radical superóxido. As ERO vêm sendo relacionadas ao esclarecimento de vários processos, como a senescência, a arteriosclerose, o câncer, e em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson em que vários indicadores de oxidação são encontrados nas regiões afetadas do cérebro. Embora esteja claro o envolvimento das ERO nestes processos, as bases bioquímicas destas manifestações patológicas ainda dependem de muitas explicações, que são dificultadas pela capacidade que estas moléculas possuem de causar danos aleatórios a diversos componentes celulares, assim como pela sua ampla atividade e distribuição biológica (Bartosz, 2009; Lu e Finkel, 2008; Andersen, 2004; Jenner, 2001).

Em contrapartida, as investigações atribuem as ERO outras atividades biológicas, até então não descritas. Por exemplo, com a descoberta da sinalização mediada por óxido nítrico surgiram pesquisas sobre outras pequenas moléculas, atribuindo-lhes funções de sinalização. Assim é que as ERO têm sido candidatas a novas moléculas sinalizadoras nas mais diversas vias. Fortes evidências de que estas moléculas podem assumir tais papéis relacionam-se aos fatos de que o peróxido de hidrogênio e o superóxido são formados por enzimas, de que EROS podem tomar parte na modificação irreversível de proteínas e de serem modificadoras moleculares que atuam no endereçamento de proteínas. Estudos sobre as atividades da ERO como sinalizadoras e mediadoras incluem ação e excreção de insulina, fatores de transcrição e crescimento, controle de proteinases, adesão, migração e proliferação celular, espermatogênese e morfogênese (Covarrubias, 2008; Bartosz, 2009).

1.5 **Antioxidantes**

A proteção contra substâncias oxidantes é feita através de moléculas redutoras chamadas de antioxidantes. Elas são definidas como quaisquer moléculas que quando presentes, mesmo em pequenas concentrações, atrasam ou impedem a oxidação de substratos oxidáveis. Os antioxidantes podem ser desde vitaminas, como o α-tocoferol e o ácido ascórbico, até enzimas, como a superóxido dismutase e a glutationa peroxidase. A importância de cada antioxidante *in vivo* é relativa e depende de qual ERO é gerada, de como é gerada, onde é gerada e de qual alvo em potencial que pode ser oxidado (Halliwell *et al*., 1995).

O α-tocoferol ou vitamina E é uma vitamina lipossolúvel que ocorre nas biomembranas e é, possivelmente, o mais importante inibidor da reação de peroxidação de lipídios em cadeia. O ácido ascórbico ou vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante capaz de reduzir o α-tocoferol, peróxidos e ERO. Estudos epidemiológicos mostram que o aumento do consumo de alimentos ricos em β-caroteno está relacionado, por sua ação antioxidante, com a diminuição da incidência de alguns tipos de câncer. A coenzima Q, característica na mitocôndria e com fundamental importância na cadeia respiratória, também pode exercer função antioxidante

no plasma onde se encontra presente em pequenas concentrações (Young e Lowe, 2001; Nordberg e Arnér, 2001; Halliwell e Gutteridge, 1999).

A γ-glutamilcisteinil glicina ou glutationa (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido gama-glutâmico. A glutationa apresenta um papel antioxidante por reduzir diretamente o H_2O_2 ou indiretamente através da glutationa peroxidase. Glutationa existe sob duas formas: a reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG). Na forma reduzida o resíduo de cisteína apresenta o grupamento tiol, cujos elétrons podem ser usados nas reações de redução de alguns compostos, enquanto na forma oxidada duas moléculas de glutationa estão ligadas através de seus grupamentos sulfidrila formando uma ponte dissulfeto (Lu, 1999). A liberação do átomo de hidrogênio presente no grupamento tiol da cisteína permite que a GSH consiga reduzir diretamente o H_2O_2 e seja utilizada como poder redutor pela glutationa S-transferase e pela glutationa peroxidase. Uma vez oxidada a glutationa pode ser novamente reduzida através da glutationa redutase, que catalisa a transferência de elétrons do NADPH para a GSSG (Pompella *et al*., 2003).

Em eucariotos, o $O_2^{\cdot -}$ pode ser reduzido até H_2O_2 por duas isoenzimas de SOD, uma mitocondrial dependente de manganês (Mn-SOD) e uma citosólica dependente de cobre ou zinco (Cu/Zn-SOD). Na reação catalisada pela SOD (Figura 6) duas moléculas de $O_2^{\cdot -}$ formam H_2O_2 e O_2 e, portanto, ela é uma das principais fontes de produção de H_2O_2 celular (Nordberg e Arnér, 2001).

Figura 6 - Reação catalisada pela SOD

$$2\,O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

A catalase é uma enzima amplamente distribuída nos seres vivos. Dentro da célula ocorre predominantemente nos peroxissomos, onde catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e O_2 (Figura 7). A quebra do H_2O_2 impede que este seja convertido em $^{\cdot}OH$ na reação de Fenton. A catalase tem reconhecida importância quando há a necessidade de remover altos níveis de H_2O_2. Em determinadas concentrações de H_2O_2 a GPX consegue manter baixa a concentração de H_2O_2. Quando não há suficiente GSH a concentração do H_2O_2 pode exceder os níveis até então

controláveis pelas GPX, então a catalase passa a atuar, cooperando desta forma com a GPX para a manutenção da concentração do H_2O_2 (Nordberg e Arnér, 2001; Baud *et al*. 2004).

Figura 7 - Reação catalisada pela catalase

$$2\,H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,H_2O$$

1.6 **Glutationa peroxidases**

Em 1957 foi identificado um fator presente no eritrócito que, por meio da glutationa (GSH), impedia a quebra da hemoglobina por oxidação. Este fator foi caracterizado como uma enzima que catalisa a oxidação da GSH usando H_2O_2 e por isso, foi chamada de glutationa peroxidase (GPX) (EC 1.11.1.9) (Mills, 1957).

Posteriormente foi descoberto que a GPX apresenta selênio na sua estrutura e que este é indispensável para suas reações catalíticas. Durante o processo de tradução o selênio é incorporado à proteína na forma de seleno-cisteína que é codificada pela sequência nucleotídica UGA presente no RNA mensageiro da GPX. A principal diferença entre a reação catalisada pela GPX e a catalisada pela heme peroxidase é que na reação da GPX a molécula doadora de elétrons, a GSH, é convertida a glutationa oxidada (GSSG), um composto que não é reativo, e nas heme peroxidases o doador de elétrons é um íon de ferro (Flohé *et al*., 1973; Ursini e Bindoli, 1987; Toppo *et al*., 2009).

Ao longo do tempo outras isoenzimas de GPX foram identificadas. Atualmente elas formam um grupo de oito isoenzimas distintas em uma família. As GPX-1 até a GPX-4 são designadas selenoglutationas porque possuem selenocisteína em seu sítio catalítico, enquanto as GPX-5, GPX-6, GPX-7 e GPX-8 são na verdade proteínas similares às selenoglutationas (Artur, 2000; Toppo *et al*., 2009).

A GPX-1 é uma proteína tetramérica que apresenta peso molecular de 85 kDa. Cada uma das quatro subunidades idênticas que a compõem possui peso molecular de 22-23 kDa e apresenta um resíduo de selenocisteína em seu sítio ativo. Em mamíferos está distribuída no citosol das células de todos os tecidos. Sua principal função parece ser a redução de

hidroperóxidos hidrossolúveis, tais como H_2O_2, DNA peroxidado e prostaglandina G2. A GPX-1 também é capaz de reduzir hidroperóxido de ácidos graxos livres, mas não consegue atuar diretamente sobre fosfolipídios de membrana. Embora apresente afinidade por uma grande variedade de substratos peroxidados, a GSH é a única molécula doadora de elétrons utilizada pela GPX-1. Isto é devido à alta especificidade do sítio de ligação da enzima para este substrato (Marinho *et al*., 1997; Toppo *et al*., 2009)

A GPX-2 ou GPX gastrintestinal (GPX-GI) foi a segunda isoenzima de GPX descrita que ocorre no citosol, esta é uma selenoproteína formada por quatro subunidades idênticas com peso molecular aproximado de 22 kDa cada. Embora seu cDNA já fosse conhecido, a enzima só foi identificada através de sua expressão em células de carcinoma mamário humano, apresenta cerca de 65% de identidade na sequência de aminoácido e 60% na de nucleotídeos com a GPX-1 humana. A especificidade da GPX-2 em relação ao substrato é similar a GPX-1 já que atuam sobre H_2O_2 e hidroperóxido de ácido graxo, mas não sobre hidroperóxido de fosfolipídio de membrana. Em ratos, o RNA mensageiro que codifica a GPX-2 está presente predominantemente nas células do trato gastrintestinal, mas em humanos ele só é encontrado no fígado e no intestino delgado (Chu *et al*., 1993; Imai e Nakagawa, 2003).

A glutationa peroxidase plasmática (pGPX ou GPX-3) foi purificada de plasma humano em 1987. Assim como a GPX-1 e a GPX-2, a GPX-3 é formada por quatro subunidades idênticas que possuem cada uma aproximadamente 23 kDa de peso molecular. Apresenta de 40 a 50% de identidade na sequência de aminoácidos com a GPX-1 humana. Entretanto, o sítio de ligação da GSH não é tão específico, o que a torna capaz de reagir com os integrantes de um sistema antioxidante composto por tiorredoxina e tiorredoxina redutase, esta última catalisa a transferência de elétrons da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) para a tiorredoxina que assim fica reduzida. A tiorredoxina é capaz de reduzir com bastante eficiência dissulfetos nas proteínas e nos peptídeos, como no caso da peroxirredoxina e da GSSG. O RNA mensageiro que codifica a GPX-3 é encontrado principalmente nas células endoteliais dos túbulos proximais e na cápsula de Bowman nos rins, embora também esteja presente no fígado e no pâncreas. A GPX-3 apresenta na sua estrutura uma porção de carboidratos que deve ser importante para o seu transporte dos tecidos para o sangue (Imai e Nakagawa, 2003; Takahashi *et al*., 1987; Nordberg e Arnér, 2001).

Em 1982 foi purificada uma proteína em fígado de porco, com uma atividade dependente de GSH contra hidroperóxidos de fosfatidilcolina, esta enzima protegeria biomembranas contra degradação oxidante e portanto foi identificada como glutationa peroxidase de hidroperóxido de fosfolipídio (PHGPX) ou GPX-4. Ao contrário das outras isoenzimas, a GPX-4 é um monômero de peso molecular de 20-23 kDa que apresenta de 30 a 40% de identidade na sequência de aminoácidos com a GPX-1 humana. Localizada tanto no citosol quanto nas membranas a GPX-4 pode ser sintetizada na forma longa mitocondrial (forma L; 23 kDa) e na forma curta não mitocondrial (forma S; 20 kDa). A forma L apresenta um peptídeo sinal (seguimento *leader*) que permite o transporte da enzima para a região intermembrana da mitocôndria e a forma S é altamente expressa no núcleo, no retículo endoplasmático e no citosol. Assim como na GPX-3, o domínio de ligação da GSH não é bem conservado, o que possibilita que a GPX-4 reaja com uma variedade de substratos doadores de elétrons ademais da glutationa reduzida (Ursini *et al*., 1982; Ursini e Bindoli, 1987; Imai e Nakagawa, 2003). Embora possa ser encontrada em outros tecidos, a GPX-4 ocorre predominantemente nos testículos. A presença da GPX-4 no sistema reprodutivo e nos órgãos endócrinos pode indicar um papel não só como antioxidante, mas na diferenciação e maturação sexual. De fato, a redução da atividade de GPX-4 em testículos de camundongos está associada com uma perda na fertilidade e na mobilidade dos espermatozoides. Isto pode ser devido às altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados presentes nos espermatozoides, o que os tornam mais susceptíveis à oxidação (Imai e Nakagawa, 2003; Kaur e Bansal, 2005). Além de ser a única isoenzima de GPX capaz de ter como substrato hidroperóxidos de fosfolipídios, ela também é capaz de reduzir o H_2O_2 e os hidroperóxidos de lipídios, incluindo aqueles derivados do colesterol. Convém ressaltar que as GPX citosólicas também podem agir indiretamente na proteção das biomembranas. Este efeito é alcançado através da atuação de uma outra enzima, a fosfolipase A_2, que hidrolisa as ligações éster que ligam o ácido graxo ao fosfolipídio. A liberação de ácidos graxos peroxidados da membrana pela fosfolipase A_2 permite que as GPX citosólicas utilizem estes lipídios como substratos (Antunes *et al*., 1995).

A GPX-5 purificada de fluídos do epidídimo não contêm selênio, sua atividade sobre peróxido de hidrogênio é inferior a 0,1% quando comparada com a GPX-1 e sua função permanece sendo investigada. A GPX-6 encontrada em glândulas do sistema olfativo contem uma cisteína no lugar da selenocisteína e o sequenciamento de seus aminoácidos revelou 40% de similaridade com a GPX-1, no entanto sua função permanece incerta (Toppo *et al*., 2009). A

GPX-7 é uma suposta GPX identificada em fibroblastos embrionários de camundongo. É uma proteína citoplasmática de 22 kDa, apresenta uma cisteína no lugar da selenocisteína em seu sítio catalítico e possui atividade detectável *in vitro* sobre hidroperóxidos de fosfolipídios. Em células de carcinoma mamário A GPX-7 aparenta ter um papel essencial no alívio do estresse oxidante gerado pelo metabolismo dos ácidos graxos poli-insaturados. Toppo *et al*.(2008) estudavam a evolução e estrutura da superfamília das glutationa peroxidases, quando suas análises filogenéticas revelaram existência de uma nova proteína, nunca antes descrita, homóloga a superfamília da GPX que, seguindo a ordem numérica, foi identificada como GPX-8, presente na classe Mamalia e Anphibia (Utomo *et al*., 2004; Toppo *et al*., 2008).

Outras proteínas com sequência de aminoácidos diferentes das glutationa peroxidases possuem atividade similar, como a glutationa S-transferase, a selenoproteína P e a peroxirredoxina 6, mas o termo “glutationa peroxidase” é atualmente usado para definir uma família de proteínas filogeneticamente relacionadas, como é evidenciado pela sequência de homologia (Toppo *et al*., 2009).

2 OBJETIVOS

- Caracterizar a atividade da glutationa peroxidase sob diversas concentrações de peróxido de hidrogênio e GSH em frações mitocondriais e microssomais hepáticas do pacu.

- Comparar as atividades das frações microssomais e mitocondriais hepáticas de pacu.

- Comparar a atividade das frações investigadas (mitocondrial e microssomal) com as mesmas frações hepáticas em camundongos SW (machos e fêmeas).

- Determinar se existe atividade de glutationa peroxidase de hidroperóxidos de fosfolipídios das frações microssomais e mitocondriais hepáticas de pacu.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os exemplares de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), com comprimento padrão de cerca de 25 cm foram obtidos na fazenda de piscicultura pesque e pague São João, em Itaocara, RJ. Os pacus sofreram eutanásia por secção da coluna vertebral imediatamente após a captura. Os fígados foram retirados e conservados em nitrogênio líquido até o momento de preparo das frações.

Os camundongos SW, machos e fêmeas, foram cedidos pelo biotério do departamento de bioquímica, eram da mesma ninhada, possuíam um mês de vida, e passaram por eutanásia usando éter e secção da coluna vertebral.

3.2 Equipamentos

Agitador tipo Vortex Phoenix AP 56; balança analítica Micronal B 200; balança de precisão Mettler Toledo AB204-S; espectrofotômetro Shimadzu UV-160 A; homogeneizador tipo Potter-Elvehjem; potenciômetro Analyser pH 300; microcentrífuga Eppendorf 5415C; ultracentrífuga refrigerada Himac CP 70G Hitachi; congelador (-70 ºC) New Brunswick Scientific; sonicador Thornton T7.

3.3 Reagentes

A glutationa reduzida, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), a β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma reduzida (NADPH), a fosfatidilcolina, a lipoxidase de soja, o

Triton X-100 e a glutationa redutase foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Ditiotreitol foi adquirido da Gibco BRL. O desoxicolato de sódio, o Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) e o metanol foram adquiridos da Merck. Todos os outros reagentes tinham alto grau analítico.

3.4 **Preparo das frações hepáticas**

Para o preparo das frações celulares os fígados foram descongelados e secos em papel de filtro e depois pesados individualmente. Os fígados foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo 0,25 M de sacarose em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (Potter, 1955) na proporção de 4 mL de tampão para cada grama de fígado.

As frações mitocondriais e microssomais foram preparadas por ultracentrifugação diferencial. O homogeneizado foi centrifugado a 800 x *g* por 5 min, o sobrenadante obtido foi então centrifugado a 20.000 x *g* por 30 min. O depósito continha a fração mitocondrial e o sobrenadante foi ultracentrifugado a 105.000 x *g* por 90 min. O depósito desta centrifugação continha a fração microssomal. Todas as etapas foram realizadas a 5 ^{o}C. As frações obtidas foram então armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do ensaio.

Para análise da cinética sob peróxido de hidrogênio e GSH foram utilizadas frações obtidas de um pool de cinco peixes. Para a comparação das atividades entre pacus e camundongos foram utilizadas frações obtidas de cinco pacus, assim como frações obtidas de cinco camundongos SW machos e cinco camundongos SW fêmeas.

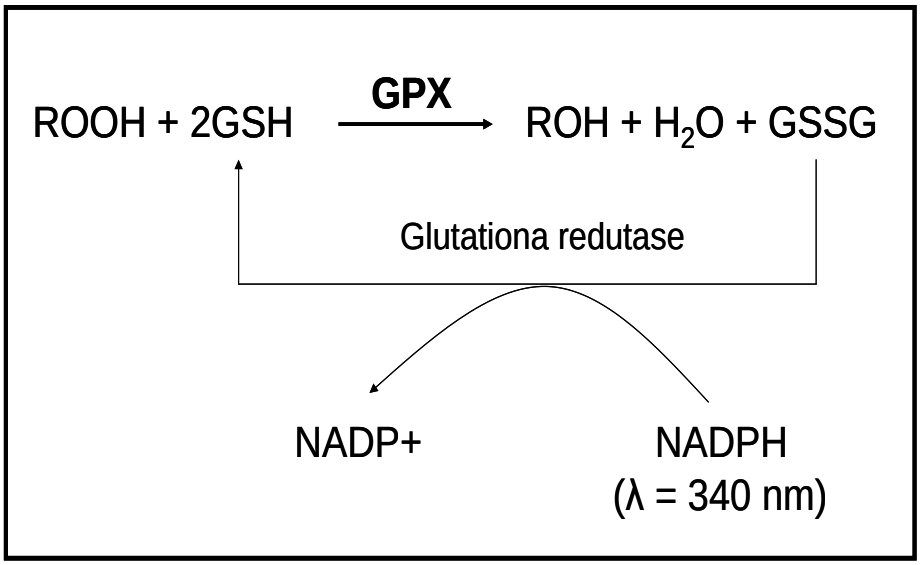
3.5 **Determinação de proteínas**

A proteína foi quantificada segundo o método de Peterson (1977) usando a albumina de soro de boi como padrão e o reativo de Folin-Ciocalteau.

3.6 Ensaio da atividade de GPX sobre peróxido de hidrogênio

O método consiste na redução da H_2O_2 pela glutationa reduzida (GSH) em uma reação catalisada pela glutationa peroxidase (GPX) presente na amostra. O produto desta reação é a glutationa oxidada (GSSG) que é reduzida continuamente pela glutationa redutase (GR) com elétrons do NADPH. Uma vez que o NADPH em solução, mas não o $NADP^+$, absorve mais intensamente a luz com comprimento de onda de 340 ηm, a diminuição da concentração do NADPH foi registrado em um espectrofotômetro a 340 ηm. As quantidades de NADPH que desapareceram foram determinadas usando o coeficiente de absortividade molar do NADPH (ε = 6,22 $mM^{-1}cm^{-1}$) (Regoli e Principato, 1995). A figura 8 mostra a reação acoplada da GPX com a GR e o desaparecimento de NADPH. Uma unidade de atividade de GPX foi expressa como 1 ηmol de NADPH oxidado por minuto.

Figura 8 - Atividade de GPX e a reação acoplada da glutationa redutase



O meio reacional continha 1 mM de EDTA, 1 mM de azida sódica, 1 mM de ditiotreitol, 0,48 mM de NADPH, 1 U/mL de glutationa redutase em solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, numa quantidade suficiente para 0,5 mL de volume final. A quantidade de proteína

presente na fração solúvel, bem como as concentrações de GSH e H_2O_2 foram padronizadas para que a enzima trabalhasse na sua velocidade máxima. A reação ocorreu a 25 ^oC. As concentrações de substrato ideais obtidas após padronização foram 8 mM de GSH e 0,35 mM H_2O_2.

3.7 **Ensaio da atividade de GPX sobre hidroperóxido de fosfatidilcolina**

A atividade foi determinada pelo desaparecimento do NADPH em que usamos GSH, glutationa redutase, EDTA, hidroperóxido de fosfatidilcolina (PCOOH) e NADPH. A mistura de ensaio continha as seguintes concentrações finais em 0,5 mL: 0.1 M de Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM de EDTA, 1.5 mM NaN_3 (azida sódica), 0.1% Triton X-100, 3 mM de GSH, 1.5 U/mL de glutationa redutase e uma alíquota da fração (Roveri, *et al.*). A oxidação não específica (branco químico) do NADPH foi registrada por 4 min a 340 ηm através de espectrofotometria. A reação enzimática foi iniciada com a adição do peróxido de fosfatidilcolina (100 μM) e a taxa de oxidação do NADPH foi registrada a 340 ηm através de espectrofotometria. A atividade foi calculada subtraindo o branco químico da taxa registrada após a adição do peróxido de fosfatidilcolina.

3.7.1 <u>Preparo do hidroperóxido de fosfatidilcolina</u>

O hidroperóxido de fosfatidilcolina foi preparado pela peroxidação da fosfatidilcolina usando lipoxidase de soja tipo IV (Roveri, *et al.*). A mistura de 22 ml de 0.2 M de Tris-HCl, pH 8.8, contendo 3 mM de desoxicolato de sódio e 0.3 mM de fosfatidilcolina foi agitada continuamente em temperatura ambiente até sua completa solubilização e então foi sonicada por 60 min. A reação foi iniciada pela adição de 0.7 mg de lipoxidase de soja (tipo IV) por 30 minutos em agitação contínua. A solução foi injetada em um cartucho Sep-Pak Plus C-18 (numero de catálogo WAT 020515, Waters, Milford, MA, USA) previamente equilibrado com 4 mL de metanol e 40 ml de água, posteriormente lavado com 220 mL de água para então proceder

a eluição do hidroperóxido de fosfatidilcolina com 2 mL de metanol. A concentração típica de hidroperóxido de fosfatidilcolina é de 2 mM, tal concentração pode ser determinada espectrofotometricamente usando uma diluição de 100 vezes em metanol e ε234 = 25,000 M^{-1} cm^{-1}. O substrato é estável a -20 ºC por pelo menos um mês.

Este método não é específico somente para a produção do hidroperóxido de fosfatidilcolina, durante o processo os lipídios oxidados poderão resultar na formação de outros dienos conjugados que absorvem no mesmo comprimento de onda dos hidroperóxidos de fosfatidilcolina (234 ηm), portanto nós utilizamos uma mesma mistura para todos os experimentos, garantindo desta forma que a concentração de hidroperóxido de fosfatidilcolina se manteve sempre a mesma em todos em ensaios realizados.

3.8 **- Gráficos e análises estatísticas**

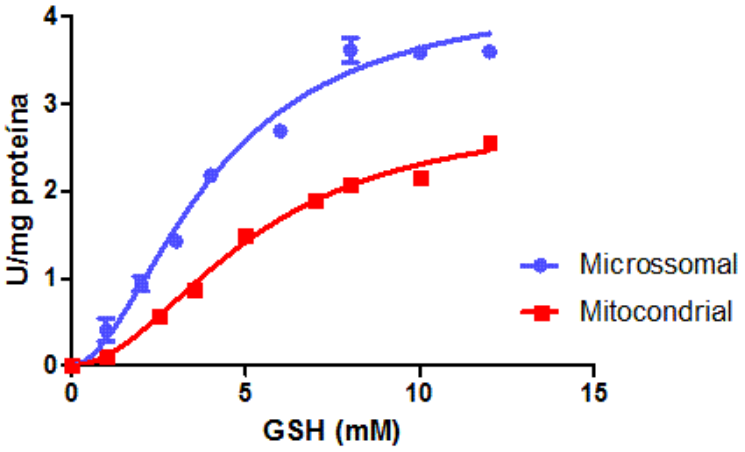
Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa Prism versão 5.0 para Windows da GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade sobre GSH

Para a determinação das curvas da atividade de GPX com diferentes concentrações de GSH o H_2O_2 foi fixado em 350 µM (Figura 9).

Figura 9 - Efeito da concentração de GSH sobre a atividade GPX



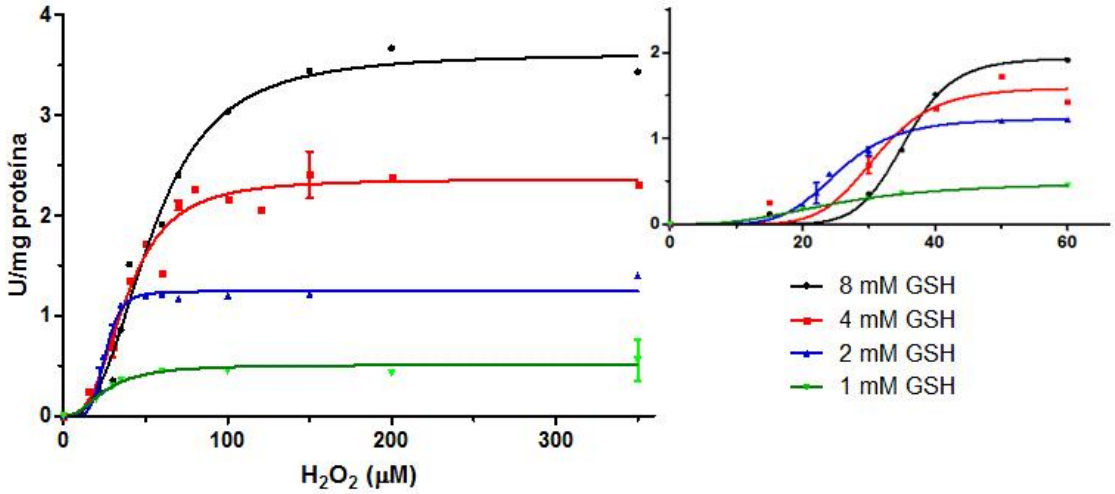
Legenda: Efeito da concentração de GSH sobre a atividade GPX com H_2O_2 (350 µM) em fração mitocondrial e microssomal hepática de pacu.

Observamos uma curva sigmoide ao variarmos a concentração de GSH usando uma concentração fixa de peróxido de hidrogênio (350 µM) em ambas as frações. Na concentração de 12 mM de GSH a atividade da fração mitocondrial chegou a 2,56 U/mg de proteína, e a Vmáx estimada foi de 2,9 U/mg de proteína, enquanto na fração microssomal observamos uma atividade de 3,56 U/mg de proteína, a Vmáx estimada de 4,3 U/mg de proteína.

4.2 Atividade sobre H_2O_2

Para as curvas de H_2O_2 cada concentração foi determinada para quatro diferentes concentrações de GSH: 1 mM, 2 mM, 4 mM e 8 mM.

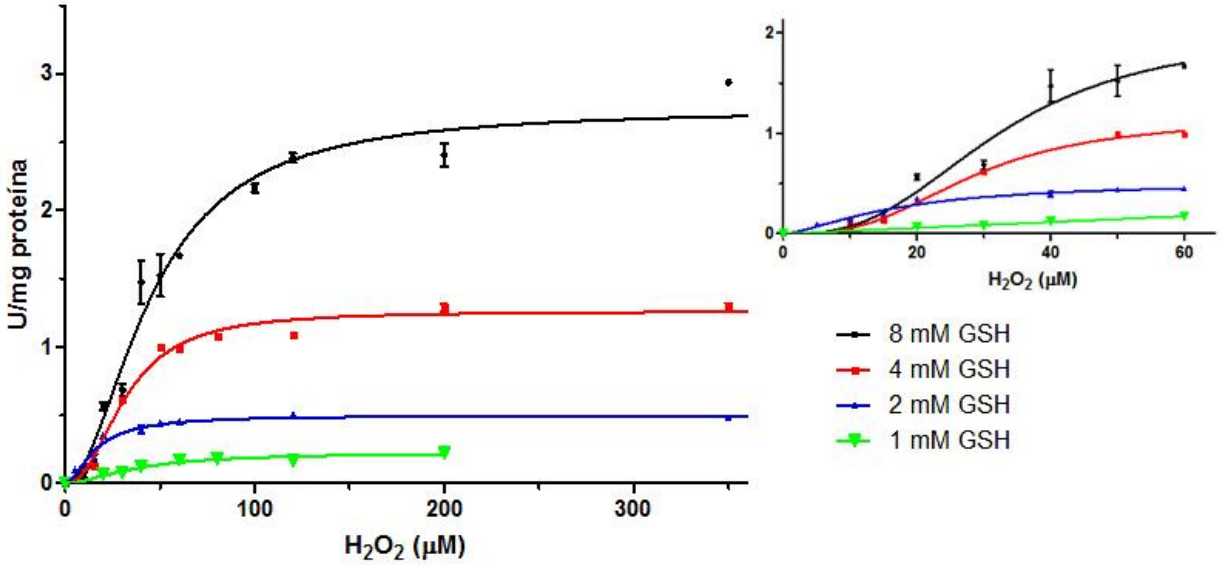
Figura 10 - Atividade de GPX sobre diversas concentrações de H_2O_2 e GSH na fração microssomal hepática de pacu



Na fração microssomal a atividade aumentou acompanhando o incremento na concentração de GSH em todos os ensaios (Figura 10). Obtivemos uma Vmáx de 3,6 U/mg de proteína quando ensaiamos com 8 mM de GSH e 256 µM de H_2O_2. A curva com 4 mM de GSH, obteve Vmáx estimada de 2,3 U/mg de proteína usando 140 µM de H_2O_2. Quando a concentração de GSH foi de 2 mM obtivemos Vmáx de 1,2 U/mg de proteína com 50 µM de H_2O_2. A curva de GSH a 1 mM registrou uma Vmáx de 0,51 U/mg de proteína usando 310 µM de H_2O_2.

No detalhe da figura 10 é possível observar melhor o comportamento sigmoide ao retirarmos os valores dos pontos maiores do que 60 µM de H_2O_2.

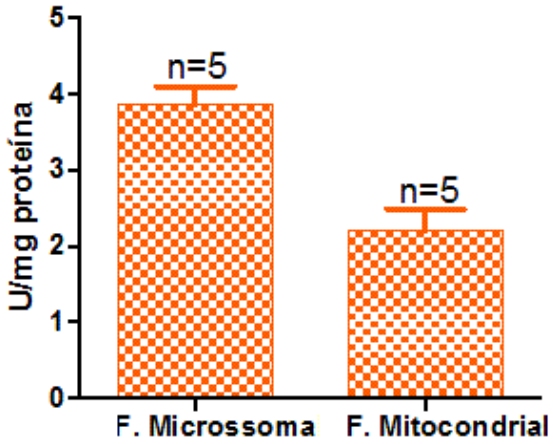
Figura 11 - Atividade de GPX sobre diversas concentrações de H_2O_2 e GSH na fração mitocondrial hepática de pacu



Na fração mitocondrial, da mesma forma que na fração microssomal, a atividade subiu acompanhando o aumento da concentração de GSH em todos os ensaios (Figura 11). Obtivemos uma Vmáx de 2,5 U/mg de proteína quando ensaiamos com 8 mM de GSH e 210 µM de H_2O_2. A curva com 4 mM de GSH obteve Vmáx estimada de 1,24 U/mg de proteína usando 250 µM de H_2O_2. Quando a concentração de GSH foi de 2 mM obtivemos Vmáx de 0,50 U/mg de proteína a 160 µM de H_2O_2. A curva de GSH a 1 mM registrou uma Vmáx de 0,22 U/mg de proteína usando 200 µM de H_2O_2.

No detalhe da Figura 11 observamos melhor o comportamento sigmoide ao retirarmos os pontos maiores do que 60 µM de H_2O_2.

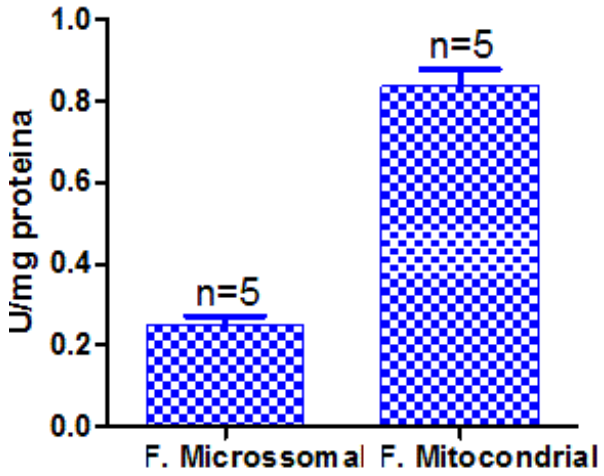
Figura 12 - Comparação entre as atividades de GPX das frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu



Legenda: Comparação entre as atividades de GPX das frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu usando 8 mM de GSH e 350 µM de H_2O_2.

Quando comparamos a atividade de GPX nas frações microssomais e mitocondriais hepáticas de pacu (Figura 12) observamos uma atividade maior na fração microssomal (3,9 U/mg de ptn) do que na fração mitocondrial (2,2 U/mg de ptn), usando 8 mM de GSH e 350 µM de H_2O_2.

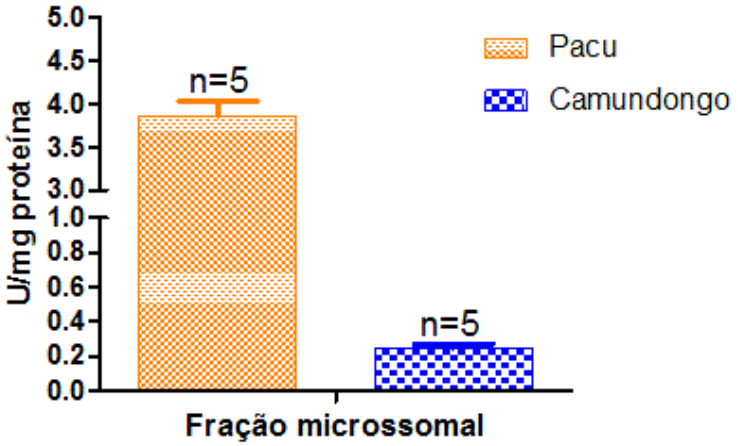
Figura 13 - Comparação entre as atividades de GPX das frações mitocondriais e microssomais hepáticas de camundongos SW



Legenda: Comparação entre as atividades de GPX das frações mitocondriais e microssomais hepáticas de camundongos SW a 8 mM de GSH e 350 µM de H_2O_2.

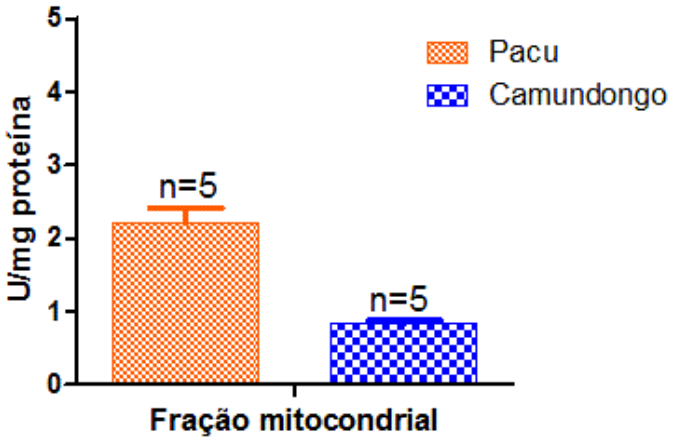
Quando comparamos a atividade de GPX nas frações microssomais e mitocondriais hepáticas de camundongos SW (Figura 13), observamos uma atividade maior na fração mitocondrial (0,838 U/mg de ptn) do que na fração microssomal (0,249 U/mg de ptn), usando 8 mM de GSH e 350 µM de H_2O_2.

Figura 14 - Comparação entre a atividade de GPX da fração microssomal hepática de pacu e camundongo



Ao compararmos fração microssomal hepática do pacu com a mesma fração em camundongos SW (Figura 14), observamos que a atividade em pacu é em torno de 15,7 vezes maior que em camundongos SW.

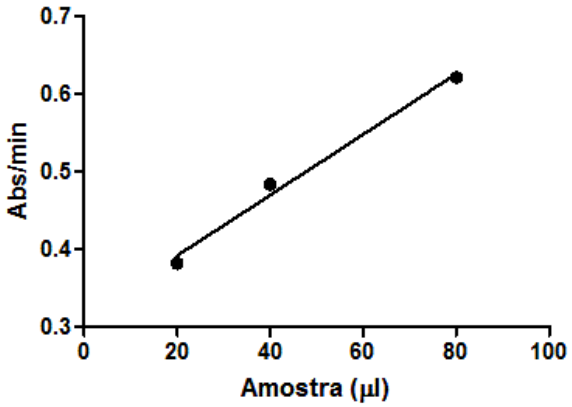
Figura 15 - Comparação entre a atividade de GPX da fração mitocondrial hepática de pacu e camundongo



Ao compararmos fração mitocondrial hepática do pacu com a mesma fração em camundongos SW (Figura 15), observamos que a atividade em pacu é em torno de 2,6 vezes maior que em camundongos SW.

4.3 **Atividade sobre PCOOH**

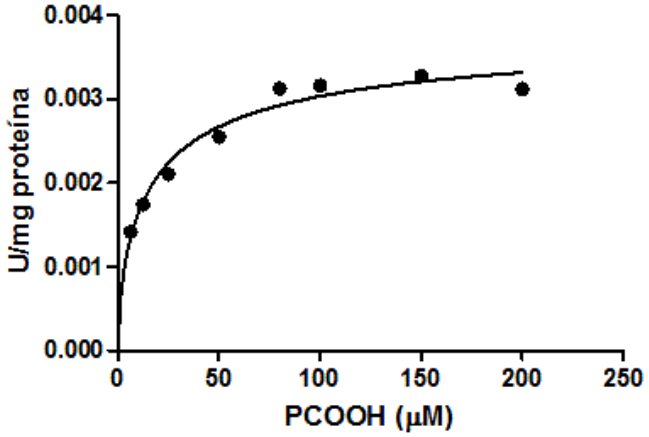
Figura 16- Efeito da adição da fração mitocondrial hepática de pacu na atividade de GPX



Legenda: Efeito da adição da fração mitocondrial hepática de pacu na atividade de GPX sobre 100 µM de PCOOH e 8 mM de GSH.

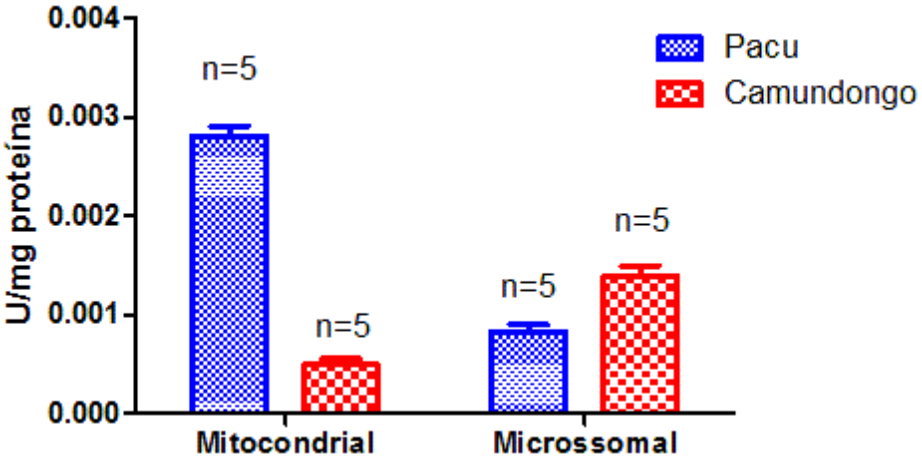
Nos ensaios da atividade de GPX sobre peróxido de fosfatidilcolina (PCOOH) observamos que, apesar da atividade baixa quando comparada com a atividade obtida sobre H_2O_2, o acréscimo de amostra influencia de forma crescente e linear a absorvância sobre o peróxido de fosfatidilcolina (Figura16).

Figura 17 – Atividade peroxidásica sobre diferentes concentrações de PCOOH e 8 mM de GSH em fração mitocondrial hepática de pacu



Variando o PCOOH e fixando o GSH em 8 mM (Figura 17), obtemos uma curva da qual obtivemos um melhor R^2 quando analisada como sigmoide (R^2 = 0,96), do que quando analisada como michaeliana (R^2 = 0,94), atingindo uma Vmáx aparente de 0,0039 U/mg de proteínas.

Figura 18 – Atividade de GPX sobre PCOOH (100 µM) nas frações microssomais e mitocondriais hepáticas de camundongo SW e pacu



Ao comparar as atividades sobre PCOOH (100 µM) nas frações microssomais e mitocondriais de pacu e camundongo, obtivemos maior nível de atividade na fração mitocondrial hepática de pacu, entretanto a fração microssomal hepática de camundongo obteve atividade significantemente maior que a mesma fração hepática de pacu.

5 DISCUSSÃO

Os resultados mostram que o pacu possui alta atividade de GPX sobre peróxido de hidrogênio nas frações mitocondriais e microssomais hepáticas, o que corrobora a hipótese de que o pacu é um peixe que adquiriu ao longo de sua evolução adaptações bioquímicas para suportar o estresse oxidante causado pelos episódios de hipoxia impostos pelo ambiente do Pantanal.

A atividade de GPX nas frações microssomal e mitocondrial de fígado de pacu nunca haviam sido ensaiadas, tampouco abordadas de um ponto de vista cinético. As informações que colhemos, mostrando a atividade de GPX nos microssomas e na membrana mitocondrial, ajudam a compreender como o pacu é capaz de resistir a grandes variações de oxigênio disponível na água. Na piscicultura as propriedades físico-químicas da água são fatores limitantes da sobrevivência e crescimento dos peixes. Quando os parâmetros da água estão adequados às exigências fisiológicas do animal obtêm-se maior produtividade e, dentre os parâmetros de qualidade críticos para a piscicultura, o oxigênio dissolvido pode ser bem importante. A resposta metabólica ao estresse oxidante varia de espécie para espécie e a resistência do pacu ao estresse oxidante pode ser a chave para o sucesso no seu cultivo (Moraes *et al*., 1997; Parma de Croux, 1995; Baldisserotto e Radünz, 2004).

Ao avaliar a atividade de GPX sobre o GSH quando fixamos a concentração de H_2O_2 observamos que ao variarem os níveis de GSH varia a afinidade da enzima pelo H_2O_2 em ambas as frações. A fração microssomal hepática de pacu apresentou maior atividade (cerca de 1,7 vezes maior) que a fração mitocondrial da mesma espécie sobre o H_2O_2.

Conforme já descrito na literatura (Toppo *et al*., 2009), quando comparamos as curvas de GSH (Figura 9) com as curvas de H_2O_2 (Figura10 e 11), os crescentes níveis de atividade obtidos com o incremento na concentração de ambos os substratos, tornam evidente que tanto o GSH, quanto o H_2O_2, atuam de forma cooperativa, e o aumento na concentração de um deles, aumenta a afinidade e a Vmáx da enzima pelo outro substrato, entretanto devemos ressaltar que os níveis intracelulares de GSH descritos para pacu são em torno de 4 mM (Bastos *et al.*, 2009) e níveis muito acima destes não correspondem aos padrões fisiológicos reais deste peixe.

O padrão sigmoide das curvas de substrato obtidas sugere que esta enzima responde rapidamente a sensíveis variações na quantidade de substrato disponível. Em altos níveis de GSH, a catálise da GPX pode dobrar de velocidade com pequenos incrementos na concentração de H_2O_2, entretanto quando a concentração de H_2O_2 aumente acima de 100 μM a enzima já não responde tão rapidamente ao acréscimo de substrato.

É possível que resposta rápida da GPX a pequenas variações na concentração de H_2O_2 permita que o pacu mantenha estas ERO em níveis bem controlados. Pequenas variações na disponibilidade de GSH permitem que a afinidade da GPX pelo H_2O_2 varie de forma significativa, servindo como um "ajuste fino" bastante eficiente na manutenção da concentração destas ERO. Quando as ERO aumentam abruptamente e os níveis de GSH disponíveis não são suficientes para que a GPX tenha grande eficiência catalítica sobre o H_2O_2, é provável que a atividade da catalase seja a chave para que estas ERO sejam metabolizadas de forma eficaz, isto se dá por causa da baixa afinidade da catalase pelo H_2O_2 quando comparada com a GPX (Radi *et al.*, 1991; Baud *et al.*, 2004). Animais com baixa atividade da GPX dependerão de altos níveis de GSH disponíveis, ou que a concentração de H_2O_2 atinja níveis bem altos para que a atividade da catalase seja eficiente, portanto estes animais podem sofrer maiores danos causados pelo acumulo destas ERO.

A possibilidade das ERO formadas pelo escape do oxigênio da cadeia respiratória reagirem rapidamente com a membrana da mitocôndria sugere que o pacu poderia possuir alguma atividade de GPX-4, que seria capaz de evitar a peroxidação lipídica em cadeia (Figura 5). Nossos resultados de atividade de GPX na membrana mitocondrial com peróxido de fosfatidilcolina (PCOOH) reforçam esta possibilidade. Observamos na figura 16 que existe atividade sobre o substrato característico da GPX-4 (PCOOH), e é proporcional a quantidade de amostra presente no ensaio. Ao avaliar a influência da concentração do PCOOH na atividade (figura 17), obtemos uma curva que se encaixa no padrão sigmoide. Comparando a suposta atividade de GPX-4 entre pacu e camundongos SW (Figura 18) observamos que a maior atividade obtida foi na fração mitocondrial de pacu (0,0028 U/mg de proteína), a qual foi 5,7 vezes maior do que a da mesma fração em camundongo (0,00049 U/mg de proteína). Entretanto, na fração microssomal observamos que a atividade em camundongo (0,0014 U/mg de proteína) foi 1,6 vezes maior que a atividade em pacu (0,00083 U/mg de proteína).

Mesmo que baixas quando comparadas com a atividade que obtivemos sobre H_2O_2, ao somarmos as atividades obtidas sobre PCOOH nas frações microssomais e mitocondriais de fígado de pacu (0,0036 U/mg de proteína) observamos que esta atividade é bem próxima da atividade de GPX-4 obtida por Roveri *et al*, 1994, em fração de membranas total (microssoma e mitocôndria) de fígado de rato, que foi de 0,004 U/mg de proteína.

É provável que a quantidade de selênio proveniente da alimentação influencie significantemente a atividade da GPX no pacu à semelhança do que é observado em mamíferos (Arteel e Sies, 2001). Estudos mais aprofundados sobre a atividade de GPX-4 neste animal parecem promissores, entretanto melhores formas de fracionamento das amostras e a purificação desta proteína presente nas frações do pacu fornecerão dados mais consistentes. Dada a importância da GSH para a eficiência catalítica da GPX, observada neste trabalho, a biossíntese e a reciclagem do GSH são peças fundamentais a serem esclarecidas para melhor entender as respostas metabólicas do pacu à hipoxia. Tais estudos serão de grande valia para os piscicultores. Tendo em vista as condições em que o pacu é adaptado à hipoxia no ambiente pantaneiro, esta espécie de peixe é um modelo adequado para investigar as consequências da isquemia e reperfusão envolvidas nos diversos processos patológicos de atual interesse na comunidade científica. Assim, mais estudos sobre enzimas antioxidantes do pacu poderão trazer informações valorosas sobre processos bioquímicos que permitem às células de vertebrados escaparem do estresse oxidante.

CONCLUSÕES

- O pacu possui alta atividade de GPX sobre H_2O_2 nas frações mitocondriais e microssomais hepáticas. A fração microssomal hepática de pacu possui atividade mais alta que a fração mitocondrial na mesma espécie, provavelmente por ser uma fração mais refinada de proteínas na qual a relação entre a proteína total e atividade específica seja maior.

- A cinética da enzima é influenciada de forma significativa pela quantidade de GSH disponível no meio, quanto maior a quantidade de GSH disponível, maior será a eficiência catalítica e a afinidade da enzima de ambas as frações pelo H_2O_2.

- Com os níveis fisiológicos normais de GSH o pacu pode controlar através da GPX o H_2O_2 proveniente do escape de ERO da cadeia respiratória. Em níveis muito altos de estresse oxidante e na ausência de GSH a atividade de GPX não é eficiente, então a atividade da catalase provavelmente colabore com a manutenção dos níveis de ERO.

- As frações mitocondriais e microssomais hepáticas de pacu apresentam atividade sobre PCOOH, o que sugere a atividade de uma GPX-4, que pode atuar diretamente na proteção das membranas deste animal, evitando os danos causados pela peroxidação lipídica.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, p. S18–S25, 2004.

ANTUNES, F.; HAN, D.; CADENAS, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H_2O_2 detoxification in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 33(9), p. 1260-1267, 2002.

ANTUNES, F.; SALVADOR, A.; PINTO, R. E. PHGPx and phospholipase A_2/GPx: comparative importance of the reduction of hydroperoxides in the rat liver mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 19(5), p. 669-677, 1995.

ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.10, p. 153-158, 2001.

ARTUR, J. R. The glutathione peroxidases. *Cellular and molecular life sciences*, v.57, p. 1825-1835, 2000.

BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.* Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.

BALDISSEROTTO, B. & RADÜNZ NETO, J. *Criação de jundiá.* Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. p.67-71.

BALDISSEROTTO, B.; SILVA, L. V. F. *Qualidade de água.* Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. p.73-92.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers?. *Biochemical Pharmacology*, v.77, p. 1303-1315, 2009.

BASTOS V. L. F. C. *et al*. Cytosolic Glutathione Peroxidase from Liver of Pacu (Piaractus mesopotamicus), a Hypoxia-Tolerant Fish of the Pantanal. *Biochimie*, v. 89, p. 1332-1342, 2007.

BAUD, O. *et al*. Glutathione Peroxidase-Catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 24(7), p. 1531-1540, 2004.

BIDINOTTO P. M.; MORAES G.; SOUZA R. H. S. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico CEPTA.* v.10, p.53-60, 1997.

CHAPMAN, L. J. *et al*. Physiological refugia: swamps, hypoxia tolerance and maintenance of fish diversity in the Lake Victoria region. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part A. v.133, p.421-437

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for silver catfish, Rhamdia quelen, fingerlings. *Journal of Applied Aquaculture.* v.9, n.4, p.11-21, 1999.

CHIPPARI-GOMES, A. G. Hypoxia tolerance and adaptations in fishes: the case of Amazon Cichlids. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds.). *Fish adaptations.* New Hampshire: Science Publishers, 2003. p.37-49.

CHU, F.; DOROSHOW, J. H.; ESWORTHY, R. S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-PI. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268(4), p. 2571-2576, 1993.

CHU, F. *et al*. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. Free Radical Biology & Medicine, v. 36(12), p. 1481-1495, 2004.

COVARRUBIAS, L. *et al*. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, v. 320, p. 1-11, 2008.

DAVIS, J. C. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *Journal fish research board Canada*. v.32, p.2295-2332, 1975.

DIANA, J. S. Water quality in ponds. In: EGNA, H. S.; BOYD, C. E. (Eds). *Dynamics of pond aquaculture*. United States: CRCPress, 1997, p. 53-71.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.

FINKEL, T.; LU, T. Free radicals and senescence. *Experimental cell research* , v.314, p. 1918-1922, 2008.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. *Glutathione peroxidase: a selenoenzyme*. FEBS Letters, v. 32(1), p. 132-134, 1973.

FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radical Biology & Medicine, v. 27(9/10), p. 951-965, 1999.

HALLIWELL, B. *et al*. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33(7), p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ed., Oxford University Press: New York, 1999. p. 936.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. Free Radical Biology & Medicine, v. 34(2), p. 145-169, 2003.

JENNER, P. Parkinson´s disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. TRENDS in Neurosciences, v. 24(5), p. 245-246, 2001.

KAUR, P. M. S.; BANSAL, M. P. Effect of selenium-induced oxidative stress on the cell kinetics in testis and reproductive ability of male mice. Nutrition, v. 21, p. 351-357, 2005.

LOPES, J. M.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. Aquaculture International. v.9, 73-80, 2001.

LU, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. FASEB Journal., v. 13, p. 1169-1183, 1999.

LUNDBERG, J. G. *et al*. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical south American rivers. Phylogeny and classification of Neotropical fishes, part 1, p. 13-47, 1998.

MARINHO, H. S.; ANTUNES, F.; PINTO, R. E. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. Free Radical Biology & Medicine, v. 22(5), p. 871-883, 1997.

MATSUO A. Y. O.; VAL, A. L. Fish adaptations to Amazonian blackwaters. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds.). Fish adaptations. New Hampshire: Science Publishers, 2003. p.37-49.

MILLS, G. C. I. Glutathione peroxidase, an enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. Journal of Biological Chemistry, v. 229, p. 189-197, 1957.

MORAES, G. *et al*. Immediate changes on metabolic parameters of the freshwater teleost fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu) under severe hypoxia. Boletim Técnico CEPTA. v.10, p.45-52, 1997.

NORDBERG, J., ARNÉR, E. J. A. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology & Medicine, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

PARMA-DE-CROUX, M. J. Tolerancia respiratoria de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae) a condiciones críticas de oxígeno. Ilheringia, Série Zoologia. v. 79, p.135-140, 1995.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Analytical Biochemistry, v. 83, p. 346-356, 1977.

PIAIA R.; TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of silver catfish exposed to different photoperiods. Aquaculture International. v.7, p. 201-205, 1999.

POMPELLA, A. *et al*. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochemical Pharmacology. v. 66, p. 1499-1503, 2003.

POTTER, V. R. Tissue Homogenates. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan (ed.). Methods in Enzymology, v. 1, p. 10-15, 1955.

RADI, R. *et al*. Detection of catalase in rat heart mitochondria. The Journal of Biological Biochemistry, v. 266 (32), p.22028-22034, 1991.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. Aquatic Toxicology, v. 31, p. 143-164, 1995.

ROVERI, A.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Methods in enzymology, v. 233, p. 202-212, 1994.

SEVERI, W.; RANTIN, F. T.; FERNANDES, M. N. Structural and morphological features of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) gills. Revista Brasileira de Biologia. v. 60(3), p. 493-501, 2000.

SCHAFER, F. Q., BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radical Biology & Medicine, v. 30(11), p. 1191-1212, 2001.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? Comptes Rendus Biologies, v. 327(7), p. 649-662, 2004.

SUNDIN, L. *et al*. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a Neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). Exp. Biology. v.203, p.1225-1239, 2000.

TAKAHASHI, K. *et al*. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distint from the known cellular enzyme. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 256(2), p. 677-686, 1987.

TOPPO, S. *et al*. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. Biochimica et Biophysica acta, 2009.

TOPPO, S. *et al*. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (GPx) superfamily. Antioxidant Redox Signal, v.10 n.9 p.1501- 1513, 2008.

TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Survival of silver catfish fingerlings exposed to acute changes of water pH and hardness. Aquaculture International. v.9, p.413-419, 2001.

TOWNSEND C. R.; SILVA, L. V.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different levels of water hardness. Aquaculture. v.215, p.103-108, 2003.

URSINI, F.; BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. Chemistry and Physics of Lipids, v. 44, p. 255-276, 1987.

URSINI, F. *et al*. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. Biochimica et Biophysica Acta, v. 710, p. 197-211, 1982.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; GREGOLIN, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochimica et Biophysica Acta, v. 839, p. 62-70, 1985.

UTOMO, A. *et al*. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. The Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 44, p. 43522 – 43529, 2004.

VAL, A.L. *et al*. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. South African Journal of Zoology, v. 33, p.107-114, 1998.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 385(1), p. 20-27, 2001.