

# Lipoperoxidação induzida pelo ÁCIDO OKADAICO

UMA TOXINA MARINHA

**William Gerson Matias**

Engenheiro sanitaria e ambientalista, doutor em Toxicologia Ambiental (Universit  de Bordeaux 2 - França). Professor do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFSC e responsável pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental - UFSC.

**Edmond Eku  Creppy**

Professor e diretor do Laboratoire de Toxicologie et d'Hygi ne Appliquée Universit  de Bordeaux 2 - França

## Generalidades sobre o ácido okadaico

O  cido okadaico (AO)   uma toxina marinha diarreica promotora de tumor e inibidora específica da atividade das proteínas fosfatases 1 e 2A. A lipoperoxidação, resultante do ataque dos fosfolipídios membranares pelos radicais livres oxigenados,   responsável por diversos efeitos tóxicos a nível celular, entre os mais importantes a citotoxicidade, a carcinogenicidade etc.

Para melhor conhecer o mecanismo de ação do AO, determinamos neste estudo se esta toxina poderia induzir em células Vero, células de origem renal, a peroxidação dos lipídios membranares.

A lipoperoxidação foi estudada pela dosagem por fluorimetria, do malondialdeido (MDA), no meio de cultura e nas células Vero. O método de dosagem consiste em uma purificação, por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAP), do complexo MDA- cido tiobarbitúrico (TBA), após a extração pelo n-butanol. Após 24 horas de incubac o, foi constatado, para uma concentração de AO de 0.75ng/ml, um aumento nas células Vero da taxa do MDA na ordem de 74%.

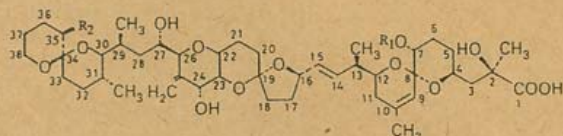
A SOD + catalase, a vitamina C e a vitamina E (captore de radicais livres oxigenados), adicionados no meio de cultura, previnem respectivamente a lipoperoxidação induzida pelo AO em células Vero.

Estes resultados parecem indicar que a via oxidativa poderá ser um dos principais mecanismos implicados na citotoxicidade e na carcinogenicidade induzida pelo AO.

Palavras-chave:  cido okadaico, células Vero, malondialdeido, lipoperoxidação, vitamina C, vitamina E.

As eflorescências marinhas (marine algal blooms) são estudadas nos últimos 200 anos (Autenrieth, 1833) e tornaram-se um grande problema de saúde pública em diversas regiões do globo, como, por exemplo, na Europa (Lassus e col., 1991). Atividades humanas induzem stress em sistemas ecológicos através de importantes poluentes, modificando o habitat, introduzindo espécies exóticas e removendo as espécies nativas. Isto sugere uma forte relação entre as atividades humanas e a crescente freq ncia das eflorescências marinhas em todo o mundo.

AO foi primeiramente isolado de esponjas negras *Holichondria okadaei* (Tachibana e col., 1981) e *Prorocentrum lima* (Murakami e col., 1982). Posteriormente, foi mostrado ser um poliéster de ácido graxo (figura 1) produzido por microalgas que se acumulam em esponjas negras e em mariscos, *Mytilus galloprovincialis* (Tubaro e col., 1992). AO   a principal toxina produzida por dinoflagelados, que acumulada nos hepatopâncreas de mariscos e ostras causa a síndrome diarreica (diarrhetic shellfish poisoning) em consumidores (Murata e col., 1982; Yasumoto e col., 1985; Kumagai e col., 1986). Ele é um potente promotor de tumor (Fujiki e col., 1987) e um específico inibidor da atividade das proteínas fosfatase 1 e 2A (Bialojan e Takai, 1988; Kume e col., 1989; Suganuma e col., 1992; Honkanen e col., 1994). Até o momento, as propriedades tóxicas do AO foram atribuídas a sua capacidade de inibir a atividade dessas enzimas, que causam efeitos em processos intracelulares e em diversos metabolismos contrácteis, genes de transcrição, estrutura de manutenção do



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	�cido okadaico
H	H	Dinophysistoxin-1
H	CH <sub>3</sub>	Dinophysistoxin-3
Acyl	CH <sub>3</sub>	

Fig. 1: Estrutura química do ácido okadaico

citoesqueleto, receptor intermediário de tradução do sinal, divisão celular e "ion-channel gating" (Cohen, 1989; Shenolikar e Nairn, 1991). A inibição em outras proteínas fosfatase serine/threonine, PP3 (Honkanen e col., 1991) e PPX (Brewis e col., 1993), também contribuiu para o estudo do efeito tóxico do AO; de qualquer maneira, faz pouco tempo do conhecimento da função fisiológica e patológica dessas enzimas. AO é uma substância neurotóxica (Candeo e col., 1992), recentemente foi mostrado que ele é um inibidor da síntese de proteínas em um sistema acelar (cell-free system) com uma CI50 de  $6.3 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  (Matias e col., 1996). Esta toxina marinha passa pela barreira transplacentária (Matias e Creppy, 1996a) e entra no ciclo entero-hepático em camundongos (Matias e Creppy, 1996b).

### Generalidades sobre radicais livres e lipoperoxidação

Na maioria das moléculas orgânicas os elétrons são aparelhados, isto é, as ligações químicas entre dois átomos A e B são feitas comumente por dois elétrons. Essas ligações podem ser rompidas de duas maneiras diferentes: seja por cisão heterolítica  $A : B \rightarrow A^+ + :B^-$  - Formação de íons seja por cisão homolítica  $A : B \rightarrow A \cdot + \cdot B$  Formação de radical livres.

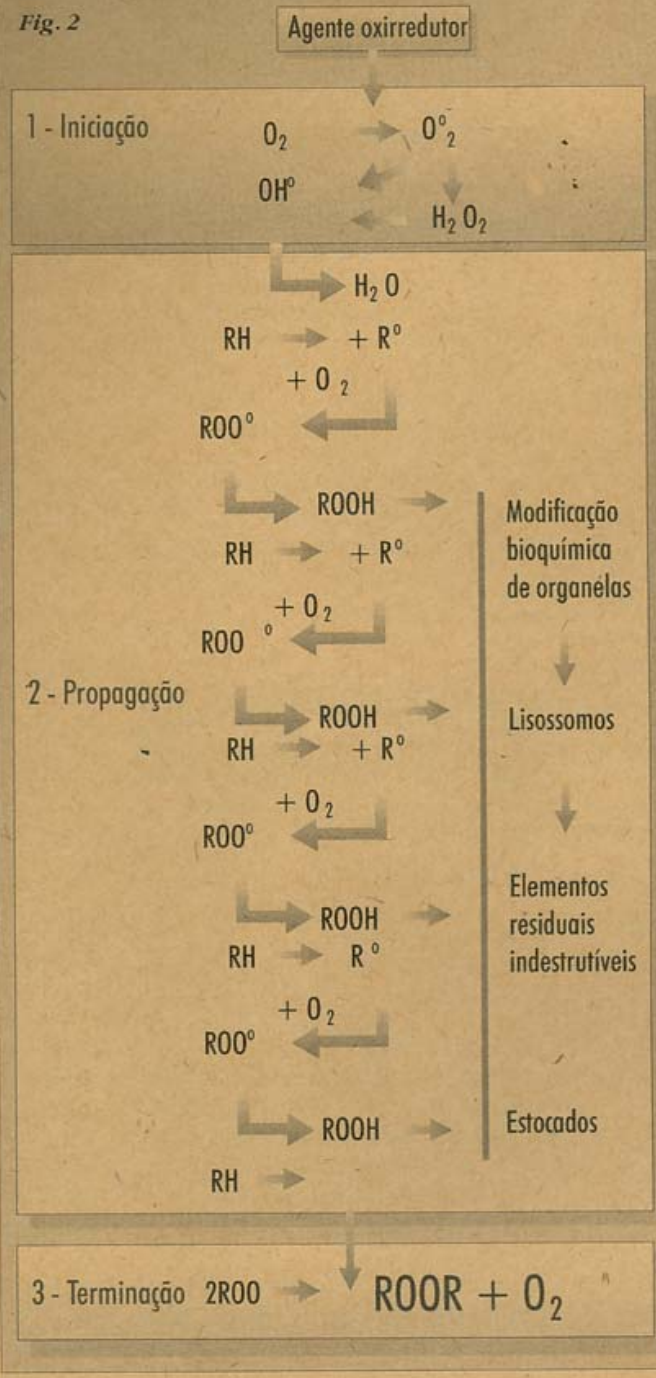
Um radical livre é, portanto, uma molécula ou um átomo que possui um elétron livre em sua camada externa.

Os radicais livres têm geralmente uma curta duração de vida e sua recombinação é quase imediata. Eles têm uma forte tendência para estabilizar sua órbita externa, a captar um elétron de um outro átomo ou molécula que se torna uma forma radicalar. Portanto, eles são muito reativos e difíceis de serem estudados. A principal fonte de energia das células aeróbias é a respiração celular ou a oxidação enzimática de nutrientes pelo  $O_2$ . O resultado desta reação é a formação de  $H_2O$  conforme a reação seguinte.  $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$  Contrariamente à reação normal, um certo número de reações enzimáticas ou não podem causar transferências elétricas monovalentes, formando radicais tóxicos. Podendo ser:  $O_2 \cdot$  íon superóxido  $H_2O_2$  peróxido de hidrogênio  $OH \cdot$  radical hidroxil

O oxigênio molecular é capaz de produ-

## Química da lipoperoxidação de membranas celulares

Fig. 2



zir reações na célula, formando radicais livres altamente reativos, e induzindo a lipoperoxidação das membranas, alterando sua integridade e aumentando sua permeabilidade (figura 2). Os radicais livres têm uma importante função fisiológica e causam grandes danos nos ácidos nucléicos, proteínas, carboidratos e lipídios (em particular os ácidos graxos polinsaturados) (Bast e Goris, 1989). Fosfolipídios membranares atacados por radicais livres oxigenados, i.e. lipoperoxidação, alteram as atividades celulares (Slater, 1984; Clavel e col., 1985; Sevanian e Hocstein, 1985; Girotti,

1990).

A lipoperoxidação é descrita como uma reação em cadeia entre o oxigênio molecular ou radicalar e os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios membranares: é uma reação de auto-oxidação que deteriora os lipídios polinsaturados (Figura 3).

O ataque por radicais livres pode ser controlado por sistemas protetores, enzimáticos ou não-enzimáticos (Clavel e col., 1985). O organismo tem diversas estratégias para prevenir a propagação de reações radiculares; por exemplo, a enzima superóxido-dismutase (SOD) catalisa a reação  $O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . A enzima catalase transforma  $H_2O_2$  em água e oxigênio  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ .

O desequilíbrio entre o ataque e a defesa implica diversas condições patológicas, incluindo arteriosclerose, envelhecimento, doenças reumáticas, várias desordens do fígado e induz toxicidade através de certos metais, solventes, pesticidas e drogas (Comparoti, 1985; Suematsu e Abe, 1982). O MDA é um biomarcador de exposição ambiental de xenobióticos que induz danos oxidativos e é um dos últimos produtos liberados no processo de lipoperoxidação, detectado in vivo e in vitro (Recknagel e col., 1982).

O mecanismo de citotoxicidade do AO ainda não foi bem caracterizado. Até o momento não existe estudo que evidencie o AO como um indutor da lipoperoxidação. Neste trabalho foi estudada a produção do MDA induzida pelo AO em cultura de células Vero. O MDA

foi medido usando a CLAP com detecção fluorescente (Jover e col., 1992; Bird e col., 1983; Yu e col., 1986). Efeitos preventivos da cadeia radicalar foram observados utilizando-se a SOD + catalase, vitamina E e vitamina C.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Produtos Químicos

AO foi comprado junto à RBI-Research Biochemicals International (Natick - USA). 1,1,3,3-Tetra-methoxypropano, superóxido-dismutase e catalase e proveniente de SIGMA (St. Louis - USA).

Metanol e etanol para a CLAP foram obtidos na Prolabo (Paris, França). A água para o sistema CLAP foi purificada usando um sistema de purificação de água MILLI Q PLUS - Millipore (Berdford - USA).

### Cultura Celular

Células Vero foram cultivadas em meio RPMI 1640 (pH 7-8) complementado com 10% de soro de feto bovino (pH6,7-8), 4% L-glutamina 200mM; penicilina (100IU/ml) e estreptomomicina (100ug/ml) a 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> (Terasima e Ysukawa, 1988).

Tratamento das células e extração do MDA

Células Vero são cultivadas em placas com múltiplos compartimentos (24 compartimentos) e tratadas com diferentes concentrações de AO (0,075; 0,75; 3,25; 7,5 e 15ng/ml) e as substâncias protetoras, SOD + catalase (24µg/ml cada uma) Vitamina C (8 e 16µg/ml) Vitamina E (2 e 6µg/ml)

Após 24h de incubação com a toxina e/ou os protetores potenciais, alíquotas de 10µl e 250µl do meio de cultura são retiradas para a dosagem de proteínas e do MDA, respectivamente. As amostras do meio de cultura destinadas à dosagem do MDA são centrifugadas para eliminar as células mortas a 800 x g durante 5 minutos a 4°C. O resto do meio é eliminado, a camada celular lavada, as células são separadas de seus suportes pela ação enzimática e recuperadas no meio RPMI com 10% de soro de feto bovino; elas são em seguida centrifugadas a 600 x g durante 5 minutos. O precipitado celular é ressuspenso em 250µl de tampão SET (NaCl 0,1 M; EDTA 20mM; Tris-HCl 50mM, pH 8) e agitado vigorosamente em um vórtex. Partes do homogeneizado celular (10µl) são retiradas para a dosagem de proteínas. Paralelamente, uma gama de amostras padrão de MDA de concentração de 100 a 1.000pmol/ml é feita.

As diluições são efetuadas com tampão SET.

As amostras celulares do meio de cultura e dos padrões são então tratadas com:

- 25µl de SDS 7%
- 300µl de Hcl 0.1 N
- 40µl de ácido fosfotungstíco 1%
- 300µl de ácido tiobarbitúrico 0.67%.

Após agitação vigorosa no vórtex, os tubos são mantidos no escuro, a 37°C, durante 1 hora, depois resfriados com gelo durante 10 minutos.

O complexo TBA-MDA formado é extra-

ído por 300µl de n-butanol.

Após centrifugação, 10 minutos, a 3.000 x g, a fase butanólica que contém o complexo MDA-TBA é retirada, purificada por CLHP, e a quantificação do MDA é realizada por fluorometria, como segue. Dosagem fluorométrica do complexo MDA-TBA

As dosagens são realizadas utilizando-se as condições cromatográficas seguintes:

- Uma coluna ODS C18 (250x8mm) de 6µm de porosidade
- A fase móvel composta de metanol: água, 4 : 6 (v/v), pH 8.4
- A vazão foi de 0,5ml/minuto.
- O volume injetado foi de 50µl.

Dosagem de proteínas O método adota-

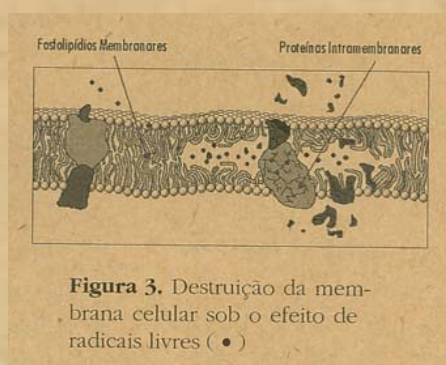


Figura 3. Destruição da membrana celular sob o efeito de radicais livres (•)

do é o de Bradford, 1976. Nas amostras reservadas para este fim, foi adicionado 1ml do reativo Biorad diluído com água destilada 1:5 (v/v). A reação é agitada e a absorbância é lida a 595nm em um espectrofotômetro UNICAN-8625 -UV/VIS. A concentração de proteínas nas amostras foi deduzida a partir de uma gama padrão de albumina sérica humana como proteína padrão.

### Análise estatística

Todos os valores encontrados neste trabalho foram expressos em médias obtidas a partir de 4 ensaios ± o desvio-padrão. Em razão do pequeno número dos efetivos, os resultados são analisados por grupos, utilizando-se o teste não-paramétrico Wilcoxon Rank - Sum Test.

### RESULTADOS

A determinação do MDA após a reação com TBA e extração com n-butanol foi adaptada para as condições de nosso laboratório (Jover e col, 1992; Bird e col.,1983; Wong e col., 1987; Yu e col., 1986) e apresentou uma grande especificidade, sensibilidade e

reprodutividade.

Como mostrado na tabela 1, células Vero em cultura produzem espontaneamente 760±25rmoles de MDA/mg de proteína após "setting", i. e. 24h após adição do etanol no controle e soluções etanólicas de AO nas células tratadas. O valor de 760±25rmoles de MDA/mg de proteína foi considerado como valor de base.

A concentração do MDA foi aumentada de 21 a 74% pelos respectivos 0.075ng/ml e 0.75ng/ml de AO após 24h de incubação. O acréscimo foi de 70% para 3.24ng/ml de AO (tabela 1). Todavia os resultados mostram que a SOD + catalase previne a lipoperoxidação induzida pelo AO, visto que o MDA produzido foi quantitativa e significativamente mais baixo quando adicionado no meio de cultura 25µg/ml de SOD e 25µg/ml de catalase, em especial para as concentrações de 0.075 a 3.25ng/ml de AO.

As tabelas 2 e 3 apresentam os resultados dos efeitos protetores por sistemas não-enzimáticos i.e. a vitamina C e vitamina E na lipoperoxidação induzida pelo AO (3.25ng/ml) após 24h de incubação. Em presença das duas vitaminas a produção de MDA foi reduzida de 1550±258 para 441±83rmoles de proteínas.

### DISCUSSÃO

A lipoperoxidação é um dos processos celulares envolvendo danos oxidativos. O oxigênio reativo iniciando o processo da lipoperoxidação pode também reagir com o DNA e causar danos ao mesmo - recentemente foi mostrada a importante função química em carcinogêneses (Ames, 1989; Park e Floyd, 1992; El Ghissassi e col., 1995). Além disso, é possível que a lipoperoxidação contribua igualmente para a genotoxicidade do AO. Se o AO pode induzir danos de origem oxidativa no DNA, este é um bom caminho para ser investigado.

O AO é conhecido como citotóxico (Cohen, 1989; Shenolikar e Narin, 1991). O mecanismo que explica esta citotoxicidade ainda não foi completamente demonstrado. A concentração 9.3 x 10<sup>11</sup> M<sup>-1</sup> i.e. 0.075ng/ml, que já aumenta a produção do MDA em 21% em cultura de células Vero, se comparada com a CI50 (2.8 x 10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup>) de um estudo da inibição da atividade da proteína fosfatase causada pelo AO em um sistema acelarar (Honkanen e col., 1994), é aproximadamente três vezes menor.

Uma possibilidade especulativa da inibição da atividade das proteínas fosfatase pode ser devida à alteração dessas enzimas pelo oxigênio radicalar reativo produzido durante o processo de lipoperoxidação.

O conjunto dos resultados provam que o AO induz em células Vero, após 24h de

incubação, a formação de radicais livres oxigenados responsáveis pela peroxidação dos lipídios membranares.

Esta lipoperoxidação parece ser um marcador biológico precoce do efeito tóxico do AO devido à produção máxima de MDA ter sido observada com uma concentração de AO de 0.75ng/ml que não causa efeito inibidor na síntese de proteína num sistema celular (ver Matias e col., 1996).

Como a síntese protéica é inibida com concentrações de AO inferiores daquelas que inibem a atividade das proteínas fosfatases 1 e 2A (Matias e col., 1996), é possível afirmar que o AO age a fracas concentrações e precocemente por peroxidação lipídica.

A SOD + catalase, a vitamina C e a vitamina E agem por oxirredução prevenindo diretamente a lipoperoxidação, detoxificando os radicais livres induzidos pela toxina nas células.

Os resultados confirmam nossa hipótese e indicam que outros mecanismos estão implicados na citotoxicidade causada pelo AO. Como as proteínas são lesadas por ação de radicais oxigenados (Davies, 1987), todos esses processos de citotoxicidade (fosforilação, inibição das sínteses de macromoléculas etc.) induzidos pelo AO podem ser devidos à formação de radicais livres oxigenados.

Por um outro lado, se a inibição da síntese de proteínas induzida pelo AO é mediada pela lipoperoxidação, ela deverá ser protegida por substâncias capazes de prevenir a lipoperoxidação. Este é um caminho que poderá ser estudado testando-se o poder protetor da SOD e da catalase sobre a inibição da síntese protéica induzida pelo AO.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Autenrieth, H.F. 1833. Über das gift der fische. Tübingen: Osiander, Germany.

Lassus, P., A. Herbland, e C. Lebaut. 1991. Toxic blooms and toxic effects along the French coast. World Aquaculture. 22 : 49-54.

Tachibana, K., P.J. Scheuer, Y. Tsukitani, H. Kikuchi, D.V. Engen, J. Clardy, Y. Gopichand e F.J. Schimitz. 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine

sponges of the genus Halichondria. J. Am. Chem. Soc. 103: 2469-2471.

Murakami, Y., Y. Oshima e T. Yasumoto. 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate

Prorocentrum lima. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 48: 69-72.

Tubaro, A., S. Sosa, M. Bruna, P.M.B. Gucci, L. Volterra e R.D. Loggia. 1992. Diarrhoeic shellfish toxins in Adriatic Sea mussels evaluated by an ELISA method. Toxicol. 30: 673-676.

Concentrações de AO (ng/ml)	Produção MDA em células Vero		Produção MDA em meio de cultura	
	Na ausência de SOD+catalase	Na presença de SOD+catalase	Na ausência de SOD+catalase	Na presença de SOD+catalase
0	760±25	689±20	304±60	258±22
0.075	922±17 *	737±36 *	349±15	114±13
0.75	1323±117 *	836±79 *	456±53	243±10
3.25	1295±43 *	876±61 *	456±30	243±60
7.50	968±100 *	775±42 *	478±47	255±22
15.00	909±24 *	630±83	500±25 *	267±31

(\* Diferença para o respectivo controle (p = 0.00)

**Tabela 2:** Efeito de diferentes concentrações de vitamina C em lipoperoxidação induzida pelo AO (3.25ng/ml) em cultura de células Vero, medida pela quantificação do MDA-TBA após 24h de incubação em três independentes experiências com quatro réplicas por concentração (n=4). Os resultados são expressados em médias ± desvio-padrão em pmoles de MDA/mg de proteína.

Concentrações de vitamina C (µg/ml)	Produção de MDA (pmoles/mg proteína) (AO 3.25ng/ml)	
	Célula Vero em cultura	Meio de cultura
0	1550±258	653±99
8	980±114 *	281±10 *
16	441±53 *	182±12 *

\* Diferença para o respectivo controle (p = 0.001)

**Tabela 3:** Efeito de diferentes concentrações de vitamina E em lipoperoxidação induzida pelo AO (3.25ng/ml) em cultura de células Vero, medida pela quantificação do MDA-TBA após 24h de incubação em três independentes experiências com quatro réplicas por concentração (n=4). Os resultados são expressados em médias ± desvio-padrão em pmoles de MDA/mg de proteína.

Concentrações de vitamina E (µg/ml)	Produção de MDA (pmoles/mg proteína) (AO 3.25ng/ml)	
	Célula Vero em cultura	Meio de cultura
0	1550±258	653±99
2	780±98 *	395±14 *
6	441±83 *	410±12 *

\* Diferença para o respectivo controle (p = 0.001)