

Caracterização da mitocôndria isolada de fígado de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e alterações da bioenergética mitocondrial causadas pela exposição ao herbicida oxifluorfena

[Characterization of liver mitochondria from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mitochondrial bioenergetics alterations caused by exposure to oxyfluorfen herbicide]

F.P. Peixoto¹, D.L. Santos², S. Vilela¹, A. Fontainhas-Fernandes²

¹Departamento de Química - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - CECAV
Apartado 1013
5000-911 – Vila Real, Portugal

²Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - CETAV/CITAB – Vila Real, Portugal

RESUMO

Descreve-se um método de isolamento de mitocôndrias acopladas de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, isoladas de células hepáticas de peixes adultos. As mitocôndrias estavam metabolicamente ativas, sendo capazes de realizarem fosforilação oxidativa, de acordo com os valores do quociente de controle respiratório. Os valores de controle respiratório obtidos com malato/piruvato (complexo I) e com succinato (complexo II) foram de $5,8 \pm 0,8$ e $3,38 \pm 0,4$, respectivamente. O potencial de membrana exibiu o valor de 197 ± 4 mV, quer se utilizasse malato/piruvato ou succinato como substrato. O procedimento de isolamento de mitocôndrias de *O. niloticus* permite o estudo do efeito de xenobióticos na bioenergética mitocondrial, tendo sido avaliada a ação da oxifluorfena ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) na bioenergética mitocondrial. Os resultados demonstram que o tratamento com oxifluorfena influencia a capacidade fosforilativa dos peixes, interferindo na sua carga energética, o que poderá levar à sua morte.

Palavras-chave: tilápia, *Oreochromis niloticus*, oxifluorfena, mitocôndria, fígado

ABSTRACT

A method for isolation of coupled mitochondria isolated from the liver of adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus* is described for the first time. They were metabolically active, able to sustain oxidative phosphorylation, as shown by respiratory control ratio values, which were about 5.8 ± 0.8 and 3.3 ± 0.4 when respiring on malate/pyruvate (complex I) or succinate (complex II), respectively, as substrate. Membrane potential exhibited a value of approximately 197 ± 4 mV for malate/pyruvate or succinate. The procedure now described for the isolation of *O. niloticus* mitochondria is an important new tool, allowing the study about the effect of xenobiotics on mitochondrial bioenergetic, being evaluated the effect of oxyfluorfen (0.6 mg L^{-1}) in the liver mitochondrial bioenergetic. These results showed that phosphorylation was significantly affected by oxyfluorfen which contributed to the decrease on the liver cell energy charge and consequently led to the fish dead.

Keywords: tilapia, *Oreochromis niloticus*, oxyfluorfen, mitochondria, liver

INTRODUÇÃO

A tilápia é um bom modelo biológico que tem sido utilizado em estudos em que se pretende avaliar o efeito de poluentes em ecossistemas aquáticos, assim como das patologias resultantes

da exposição a esses poluentes (Almeida et al., 2002; Figueiredo-Fernandes et al., 2006; Garcia-Santos et al., 2007). De fato, a tilápia tem sido utilizada como uma espécie sinalizadora em alguns programas de avaliação ambiental (Gadagbui et al., 1996).

Recebido em 6 de novembro de 2008

Aceito em 10 de março de 2009

E-mail: fpeixoto@utad.pt

Os herbicidas representam cerca de 40% dos pesticidas produzidos anualmente em todo o mundo. O oxifluorfena é um herbicida frequentemente utilizado na agricultura para controlar ervas indesejadas. No entanto, é conhecido o efeito negativo no metabolismo da tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* (Banhawy et al., 1996), em que o fígado responde com o aumento da expressão de algumas proteínas (hsp74 e hsp73) normalmente induzidas por situações de estresse (Hassanein et al., 1999). O tratamento com oxifluorfena provoca na tilápia uma inibição da acetilcolinesterase (Hassanein, 2002).

O fígado desempenha um papel vital em diversas vias metabólicas dos peixes (Moon et al., 1985), sendo o principal órgão onde ocorre acumulação, biotransformação e excreção de produtos do metabolismo de xenobióticos (Triebkorn et al., 1994).

As mitocôndrias podem ser encontradas em quase todas as células eucariotas, sendo a sua principal função a produção de energia. Desse modo, a mitocôndria desempenha um papel central na bioenergética dos organismos, dado que mais de 90% da energia utilizada pela célula eucariota é obtida da fosforilação oxidativa associada à membrana interna mitocondrial (Mitchell, 1961). Assim, é legítimo admitir que os poluentes podem afetar o normal funcionamento da mitocôndria, comprometendo seriamente a viabilidade celular e o próprio ser vivo. Neste contexto, a mitocôndria isolada de fígado de rato tem sido frequentemente apresentada como um bom modelo para a realização de estudos de toxicidade (Palmeira et al., 1994; Peixoto et al., 2004). São conhecidos poucos os estudos toxicológicos em que é utilizada mitocôndria de peixe (Mishra e Shukla, 1994, 1995), no entanto este é certamente um bom modelo.

Não se conhecem estudos relativos ao efeito do oxifluorfena na bioenergética mitocondrial animal; foi, no entanto, descrito o efeito deste na protoporfirinogênio oxidase (Jung e Black, 2004), uma enzima localizada na membrana interna da mitocôndria (Davids et al., 2006).

Este trabalho teve como objetivo estudar o isolamento de mitocôndrias de fígado de tilápia-

do-nilo *Oreochromis niloticus* para avaliação do mecanismo toxicológico do oxifluorfena.

MATERIAL E MÉTODOS

As tilápias foram fornecidas pelo Institut National de Recherche Agronomique (Rennes, França) e mantidas em condições de laboratório na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. A temperatura da água foi mantida constante, $25\pm 1^\circ\text{C}$, e o fotoperíodo foi controlado durante 12h de claro/escuro. Foi fornecida oxigenação suplementar em cada tanque para manter os níveis de oxigênio próximos da saturação. Os principais parâmetros de qualidade da água, teores de amônia, nitritos, nitratos e sólidos em suspensão foram controlados periodicamente, sendo mantidos de acordo com os limites considerados satisfatórios para a espécie, mediante filtração biológica e mecânica (Garcia-Santos et al., 2007).

Foi delineado um procedimento experimental para avaliar o efeito da exposição a uma concentração subletal de oxifluorfena. Seis tilápias em idade adulta, com peso e tamanho médios de $142,3\pm 9,9\text{g}$ e $19,3\pm 1,5\text{cm}$, respectivamente, foram expostas em três tanques de 100L em água com $0,6\text{mgL}^{-1}$ de oxifluorfena durante 21 dias. A concentração de oxifluorfena foi mantida constante por meio da renovação periódica do meio. O grupo-controle (seis tilápias) foi mantido em outros três tanques, em condições idênticas, em água doce, sem adição de oxifluorfena.

Os peixes foram anestesiados com 2-fenoxietanol e em seguida decapitados. O fígado (hepatopancreas) foi imediatamente extraído e mergulhado em meio de isolamento refrigerado (4°C) constituído por sacarose 200mM, KCl 75mM, MgCl_2 5mM, EGTA 2mM, ditioeritritol 5mM, BSA (0,5%) e Hepes 5mM (pH 7,4). O fígado foi finamente cortado e lavado três vezes com meio de isolamento refrigerado e em seguida homogeneizado com 20mL do mesmo meio, utilizando um sistema de homogeneização do tipo Potter-Elvehjem. Os componentes de maiores dimensões (núcleos, células intactas, entre outros) foram removidos por centrifugação¹ a $755 \times g$ durante cinco minutos em centrífuga¹. A gordura encontrada no sobrenadante foi

¹Centrifuga Sigma 2-16K - Osterode am Harz, Alemanha.

removida por sucção, e o sobrenadante restante, contendo mitocôndrias, transferido para outro tubo de ensaio e centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos, para sedimentação das mitocôndrias. O sedimento mitocondrial foi cuidadosamente ressuspense em meio de isolamento refrigerado, sem BSA, e novamente sedimentado a uma força centrífuga de 12.000 x g durante 10 minutos e, finalmente, ressuspense em sacarose 250mM e Hepes 5mM (pH 7,4).

O potencial de membrana foi determinado monitorizando a distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP⁺), com recurso a um eletrodo seletivo ao íon TPP⁺, preparado de acordo com Kamo et al. (1979). Neste método, o potencial do eletrodo é linear relativamente ao logaritmo da atividade do íon TPP⁺, com um declive de 58mV, de acordo com a equação de Nernst e a lei da conservação das massas, e assumindo que o volume mitocondrial interno é de 1.1µL/mg prot. O TPP⁺ foi adicionado a uma concentração de 3µM de forma a permitir determinações precisas e evitar qualquer ação tóxica sobre a mitocôndria. O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas foi determinado com o uso de eletrodo do tipo Clark² ligado a um monitor de oxigênio biológico, e realizando-se os ensaios num meio constituído por sacarose 200mM, KCl 2mM, NaH₂PO₄ 2mM e Hepes 10mM (pH 7,4), a um volume final de 1mL à temperatura de 25°C. O índice de controle respiratório foi calculado pela razão entre o oxigênio consumido no estado 4 (ausência de ADP) e 3 (na presença de ADP 150µM), em câmara termostatizada com agitação do meio contido no seu interior, com a utilização de eletrodo de oxigênio do tipo Clark acoplado a um registador³. A razão ADP/O foi calculada dividindo a concentração de ADP adicionado pelo respectivo oxigênio consumido no estado respiratório 3. Os consumos de oxigênio foram obtidos com dois substratos diferentes: piruvato/malato (5/25µmol) e succinato (10µmol).

A concentração de proteína da preparação mitocondrial foi determinada pelo método do biureto (Gornall et al., 1949).

RESULTADOS

A concentração de oxifluorfena utilizada (0,6mgL⁻¹) corresponde a 1/5 do LC₅₀ determinado às 96 horas em tilápia. Verificou-se que, ao se utilizarem de peixes de menor dimensão (±50g), as mitocôndrias obtidas não apresentavam funcionalidade tão boa, em comparação com as obtidas de peixes de maiores dimensões (resultados não publicados).

Os resultados do potencial de membrana mostram que a integridade membrana era adequada, uma vez que, pela oxidação de succinato, as mitocôndrias apresentaram potencial de membrana na ordem de 197mV; foi possível observar que, após fosforilação (100nmol ADP), o potencial era totalmente recuperado (Fig. 1A). Tilápias tratadas com oxifluorfena 0,6mgL⁻¹ (Fig. 1B) apresentaram decréscimo no potencial de membrana máximo obtido pela oxidação de 5mM de succinato. O tempo necessário para a fosforilação foi maior e a despolarização foi menor que no grupo-controle.

Os resultados obtidos na respiração mitocondrial com substratos para os complexos I e II (Fig. 2) mostram maior eficiência respiratória quando da ativação do complexo I. Este resultado permite concluir quanto à eficiência do método de isolamento de mitocôndrias, pois, apesar de a atividade do complexo I ser bastante lábil quando comparada com a do complexo II, a atividade do complexo I foi bastante preservada.

Na Tab. 1, apresentam-se os resultados do índice de controle respiratório (ICR), que fornece indicação acerca da capacidade respiratória, e ADP/O sobre a eficiência fosforilativa.

Tabela 1. Índice de controle respiratório (ICR) e ADP/Oxigênio, segundo o substrato. Valores expressos como a média±SEM de seis ensaios independentes

Substrato	ICR	ADP/O
Piruvato/Malato	5,8±0,8	2,8±0,3
Succinato	3,3±0,4	1,9±0,2

²Yellow Springs Instruments - Yellow Springs, Ohio, EUA.

³Kipp & Zonen - Delft, Holanda.

Caracterização da mitocôndria...

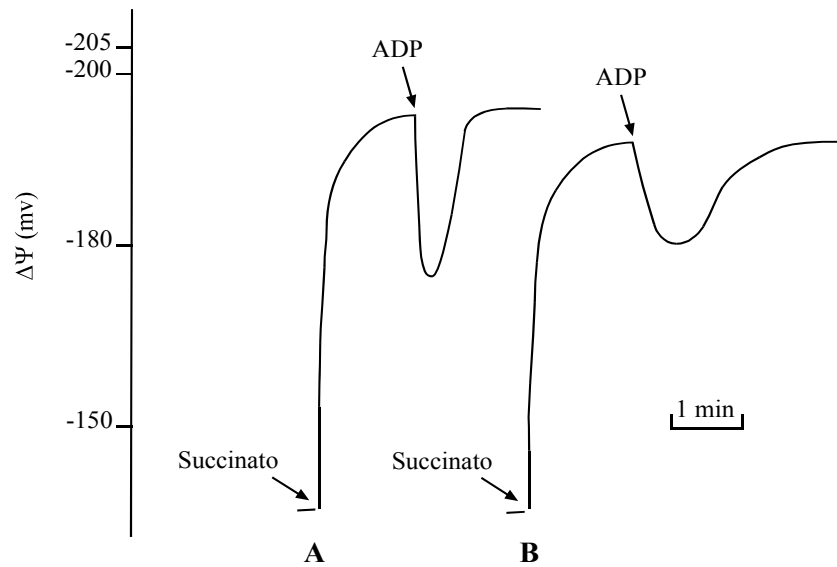


Figura 1. Registro típico da variação do potencial elétrico transmembranar ($\Delta\psi$) de mitocôndrias de fígado de tilápia-do-nilo. As mitocôndrias (0,8mg de proteína total) foram incubadas, a 20°C, em 1mL de meio de reação (sacarose 200mM, K_2HPO_4 1mM, KCl 20mM, 1,25 μ M rotenona e HEPES 10mM, pH 7,4), suplementado com cloreto de tetrafenilfosfônio (TPPCL) 3 μ M. Na presença de oxifluorfena (0,6mgL⁻¹) (B), o controle (A) foi realizado em mitocôndrias isoladas de tilápias mantidas na ausência de oxifluorfena. As mitocôndrias foram energizadas com a adição de succinato (5 μ mol). Os traços representam registros típicos verificados em seis ensaios independentes com preparações mitocondriais diferentes.

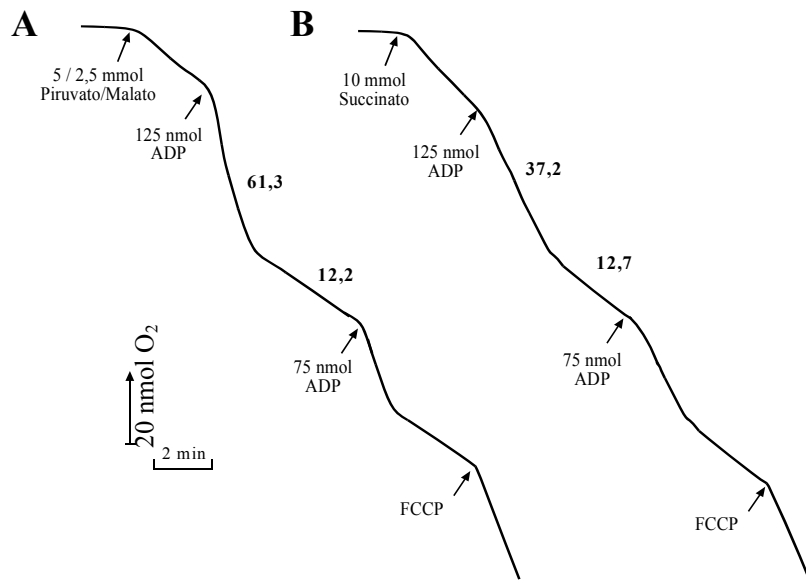


Figura 2. Registros típicos do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de fígado de tilápia-do-nilo. As mitocôndrias (0,8mg de proteína total) foram incubadas, a 20°C, em 1mL de meio de reação (sacarose 200mM, K_2HPO_4 1mM, KCl 20mM, 1,25 μ M rotenona e HEPES 10mM, pH 7,4). Em B, o meio foi suplementado com rotenona 1nM. A respiração iniciou-se pela adição de substratos respiratórios. Decorridos três minutos, foi adicionado ADP (75nmol), o qual se repetiu passado algum tempo. O traço representa registros típicos verificados em seis ensaios independentes com preparações mitocondriais diferentes.

DISCUSSÃO

O oxifluorfena é muito utilizado na região mediterrânea, podendo ser prejudicial ao organismo aquático (Hassanein et al., 1999; Hassanein, 2002). É um princípio ativo de um herbicida da classe dos peroxidantes, com capacidade de induzir peroxidação lipídica (Yamamoto et al., 1996), alterar o conteúdo em ácidos graxos no fígado e influenciar a atividade das enzimas do estresse oxidativo (Peixoto et al., 2006). Considerando-se a que a atividade mitocondrial é dependente da integridade da membrana, admite-se que o oxifluorfena possa interferir de forma negativa na mitocôndria. Assim, foi avaliado o efeito do oxifluorfena ($0,6\text{mgL}^{-1}$) na respiração mitocondrial em fígado de tilápia, dado que é um órgão rico em mitocôndria e, pelo fato do oxifluorfena se acumular no fígado (Chemical..., 1984), interagindo com uma enzima localizada na membrana interna da mitocôndria (Davids et al., 2006).

Os resultados mostram que o oxifluorfena não causou alterações significativas na respiração mitocondrial, quer estimulada pelo piruvato/malato (complexo I), quer pelo succinato (complexo II) (Fig. 2). No entanto, o registro do potencial de membrana indica a existência de alguns efeitos significativos (Fig. 1). O potencial máximo atingido pela energização com succinato foi diminuído pelo tratamento com oxifluorfena. O tempo necessário para obter a fosforilação completa do ADP adicionado também foi negativamente afetado. A menor despolarização quando da adição de ADP é um indicador de menor eficiência fosforilativa, a qual, no entanto, não foi possível observar pelos registros relativos ao consumo de oxigênio em estado 3. Esse efeito na fosforilação pode resultar da ação oxidativa induzida pelo oxifluorfena (Peixoto et al., 2006), que poderá conduzir à indução da produção de formas reativas de oxigênio na mitocôndria, causando, desse modo, desacoplamento membranar. O oxifluorfena induziu a um aumento no índice de insaturação dos lipídios do fígado (Peixoto et al., 2006). É possível por isso admitir que o mesmo fato tenha ocorrido nas membranas das mitocôndrias isoladas do fígado, dessa forma a fluidez da membrana seria maior devido ao tratamento com oxifluorfena. Esse aumento no

conteúdo de alguns ácidos graxos insaturados já foi descrito em plantas (Watanabe et al., 2001) e, em animais, também se observou que situações de estresse oxidativo podem perturbar o metabolismo dos lipídios (Yamamoto et al., 1996). Não se registaram efeitos do consumo de oxigênio, contrariamente ao observado no potencial de membrana, fato que pode ser explicado pela maior sensibilidade da própria técnica.

Mishra e Shukula (1994), ao avaliarem a toxicidade de concentrações subletais de endossulfão na bioenergética do fígado de mitocôndrias isoladas de peixe-gato (*Clarias batrachus*), sugeriram um efeito na eficiência fosforilativa por ação direta na ATPase. Apesar de a espécie utilizada e de o tóxico utilizado serem diferentes, é evidente que este tipo de estudo pode permitir a avaliação toxicológica resultante da contaminação de cursos d'água com pesticidas. Neste tipo de estudo, deve ser bem escolhida a população-alvo, assim como o seu estado de desenvolvimento. Peixes maiores e com maior teor em gordura podem apresentar maior resistência, na bioacumulação de alguns tóxicos na gordura, em particular quando se trata de pesticidas lipossolúveis (Munoz-de-Toro et al., 2006; Shi et al., 2006).

A concentração de oxifluorfena utilizada no ensaio, ainda que subletal, mostrou ser capaz de afetar a capacidade fosforilativa, mesmo em peixes adultos de grande dimensão. Do exposto, pode-se admitir que o efeito na bioenergética em peixes menores é mais significativo, pois as tilápias adultas de menor dimensão tratadas com oxifluorfena apresentaram mortalidade de, aproximadamente, 15% (resultados não publicados). No entanto, no ensaio com tilápias de maior dimensão, não se registou mortalidade durante o período em que decorreu o ensaio (21 dias).

CONCLUSÕES

O oxifluorfeno interfere na bioenergética mitocondrial. A mitocôndria isolada de tilápia pode ser utilizada em novos estudos de toxicologia ambiental aquática. Dado que a mitocôndria é a principal responsável pela produção de energia na célula, é normal que os tóxicos possam afetar a sua funcionalidade, colocando em questão a viabilidade do animal.

Estes resultados levantam, por isso, algumas questões a serem esclarecidas em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.A.; DINIZ, Y.S.; MARQUES, S.F.G. et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *in vivo* cadmium contamination. *Environ. Int.*, v.27, p.673-679, 2002.
- BANHAWY, MA.; SOLIMAN, FM.; ABDEL-REHIM, SA. et al. Metabolic changes in the Nile boliti *Oreochromis niloticus* exposed to different concentrations of the herbicide (Goal). *Proc. Egy. Acad. Sci.*, v.46, p.99-117, 1996.
- CHEMICAL profile: Oxyfluorfen. Washington, DC: USEPA, Environmental Effects Branch, 1984.
- DAVIDS, L.M.; CORRIGALL, A.V.; MEISSNER, P.N. Mitochondrial targeting of human protoporphyrinogen oxidase. *Cell Biol. Int.*, v.30, p.416-426, 2006.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; ROCHA, E. et al. Effects of gender and temperature on hepatic EROD activity, liver and gonadal histology in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.51, p.626-632, 2006.
- GADAGBUI, B.K.M.; ADDY, M.; GOKSØYR, A. Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudfish (*Clarias anguillaris*), *Comp. Biochem. Physiol.*, v.114, p.201-211, 1996.
- GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J. et al. Histological alterations in gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* caused by cadmium. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.376-381, 2007.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol.Chem.*, v.177, p.751-766, 1949.
- HASSANEIN, H.M.A. Toxicological effects of the herbicide oxyfluorfen on acetylcholinesterase in two fish species: *Oreochromis niloticus* and *Gambusia affinis*. *J. Environ. Sci. Health, Part A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, v.37, p.521-527, 2002.
- HASSANEIN, H.M.A.; BANHAWY, M.A.; SOLIMAN, F.M. et al. Induction of hsp70 by the herbicide oxyfluorfen (Goal) in the egyptian nile fish, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.37, p.78-84, 1999.
- JUNG, Y.L.S.; BACK, K. Expression of human protoporphyrinogen oxidase in transgenic rice induces both a photodynamic response and oxyfluorfen resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.80, p.65-74, 2004.
- KAMO, N.; HONGO, R.; KOBATAKE, V. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.*, v.49, p.105-121, 1979.
- MISHRA, R.; SHUKLA, S.P. Effects of endosulfan on bioenergetic properties of liver mitochondria from the freshwater catfish *Clarias batrachus*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.50, p.240-246, 1994.
- MISHRA, R.; SHUKLA, S.P. Effects of endosulfan on bioenergetic properties of skeletal muscle mitochondria from the freshwater catfish (*Clarias batrachus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.112C, p.153-161, 1995.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, v.191, p.144-145, 1961.
- MOON, T.W.; WALSH, P.J.; MOMMSEN, T.P. Fish hepatocytes - a model metabolic system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.42, p.1772-1782, 1985.
- MUNOZ-DE-TORO, M.; BELDOMENICO, H.R.; GARCIA, S.R. et al. Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. *Environ. Res.*, v.102, p.107-112, 2006.
- PALMEIRA, C.M.; MORENO, A.J.; MADEIRA, V.M.C. Interactions of herbicides 2,4-D and Dinoseb with liver mitochondrial bioenergetics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.27, p.50-57, 1994.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D. et al. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.85, p.91-96, 2006.

PEIXOTO, F.; CARVALHO, M.J.M., ALMEIDA, J. et al. Daphnetoxin interacts with mitochondrial oxidative phosphorylation and induces membrane permeability transition in rat liver. *Planta Med.*, v.70, p.1064-1068, 2004.

SHI, L.L.; SHAN, Z.J.; KONG, D.Y. et al. The health and ecological impacts of organochlorine pesticide pollution in China: Bioaccumulation of organochlorine pesticides in human and fish fats. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, v.12, p.402-407, 2006.

TRIEBSKORN, R.; KOHLER, H.R.; FLEMMING, J. et al. Evaluation of bis(tri-n-butyltin)oxide (tbto) neurotoxicity in rainbow-trout (*Oncorhynchus-mykiss*) .1. behavior, weight increase, and tin content. *Aquat. Toxicol.*, v.30, p.189-197, 1994.

WATANABE, K.; OHORI, Y.; SATO, Y. et al. Changes in fatty acid composition of neutral lipid in mung bean cotyledons by oxyfluorfen-induced peroxidation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v.69, p.166-173, 2001.

YAMAMOTO, Y.; NAGATA, Y.; KATSURADA, M. et al. Changes in rat plasma-free fatty acid composition under oxidative stress induced by carbon tetrachloride: decrease of polyunsaturated fatty acids and increase of palmitoleic acid. *Redox Rep.*, v.2, p.121-125, 1996.