

3

Toxicidade dos HPAs

3.1.

Considerações Gerais

O primeiro relato de câncer como efeito da exposição ao piche, ao alcatrão e à fuligem foi feita pelo cirurgião Sir Percival Pott, em 1775, quando reportou a alta incidência de câncer no órgão reprodutor masculino entre limpadores de chaminés na Grã-Bretanha (Pereira Netto *et al.*, 2000; Bjørseth & Ramdahl, 1985 *apud* Lima, 2001), embora, somente em 1931, o benzo(a)pireno do carvão tenha sido isolado e sintetizado (Costa, 2001).

Atualmente, pesquisas da Agência Internacional de Estudo do Câncer (IARC) classificam alguns HPAs como carcinogênicos e/ou mutagênicos e/ou genotóxicos (Quadro 1).

Compostos carcinogênicos são aqueles capazes de induzir um carcinoma, tumor maligno com tendência a produzir metástase. Evidências sobre a carcinogenicidade dos HPAs são indicadas principalmente por estudos de exposição ocupacional a misturas de HPAs resultantes de processos como a produção de coque, refinamento do petróleo, entre outros (EPA, 2000).

Já compostos mutagênicos são capazes de induzir ou aumentar a frequência de mutação no cromossomo de um organismo e compostos genotóxicos são aqueles com capacidade de induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos.

Uma substância genotóxica é tóxica para o DNA. Ela pode se unir diretamente a ele ou atuar indiretamente afetando as enzimas ligadas a sua replicação, levando a mutações que podem levar ao aparecimento de um câncer. No entanto, vale ressaltar que substâncias genotóxicas não são necessariamente cancerígenas.

Estudos *in vitro* mostram que o benzo[a]pireno induz danos em células procarióticas, eucarióticas e células de mamíferos produzindo efeitos genotóxicos variados, incluindo mutações genéticas em células somáticas, formação de adutos de DNA, síntese de DNA não programada, entre outros

(EPA, 2000). É importante ressaltar que muitos desses compostos, ao serem metabolizados, podem dar origem a compostos mais tóxicos do que o original.

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental americana (US EPA) prioriza o monitoramento de 16 HPAs baseado em suas características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas: naftaleno, antraceno, pireno, criseno, fenantreno, benzo(a)pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno.

A exposição humana (e de outros animais) aos HPAs ocorre por diferentes vias. As mais importantes são a inalação de ar poluído e a ingestão de alimentos ou água contaminada.

Quadro 1. Carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPAs.

HPA	Carcinogenicidade ¹	Genotoxicidade ²	Mutagenicidade ³
Fluoreno	I	L	
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Fluoranteno	N	L	+
Pireno	N	L	+
Benzo(a)antraceno	S	S	+
Criseno	L	L	+
Benzo(e)pireno	I	L	+
Benzo(a)pireno	S	S	+
Perileno	I	I	+
Indeno(1,2,3-cd)pireno	S	I	+
Benzo(g,h,i)perileno	I	I	+
Dibenzo(a,h)antraceno	S	S	+
Coroneno	I	I	+

Fonte: Costa, 2001

S = suficientes; I = insuficientes; L = limitados; N = não carcinogênico. Genotoxicidade foi avaliada através dos testes de deterioração do DNA; aberração cromossômica e mutagenicidade. Mutagenicidade (teste de Ames): + (positivo), - (negativo).

3.2.

Metabolismo dos HPAs em peixes

Para assegurar sua sobrevivência, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa para a proteção de suas células na presença de

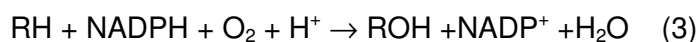
xenobióticos. Estes envolvem: a absorção, a distribuição, a biotransformação e a excreção das substâncias estranhas.

A absorção em peixes ocorre por várias rotas, incluindo a alimentação e o transporte direto através das membranas externas, sendo então distribuídos para as diversas partes do corpo.

A biotransformação (metabolização) geralmente leva a formação de compostos mais polares, portanto, mais hidrofílicos, conseqüentemente mais facilmente excretados do que seu composto original. O órgão mais comumente envolvido neste processo é o fígado. O fígado atua na emulsão de gorduras através da produção da *bílis*, na metabolização de substâncias presentes na corrente sanguínea e produção de vários compostos, como por exemplo, proteínas. Esta atuação é devida a sua posição estratégica e por suas células (hepatócitos) estarem entre as células mais ricamente perfundidas do organismo (Livingstone, 1998; van der Oost, 2003).

A biotransformação geralmente envolve dois estágios distintos, referidos como reações da Fase I e da Fase II (Figura 3). Na Fase I, a biotransformação de xenobióticos ocorre através de reações de redução, hidrólise e/ou oxidação, sendo responsáveis por introduzir grupos funcionais no xenobiótico (Livingstone, 1998). A principal reação é a oxidação, catalisada principalmente pelo citocromo P-450 monooxigenase, pelas monoamino oxidases (MAO) e pelas flavinas monooxigenase (FMO) (Bastos, 2001).

As monooxigenases do citocromo P-450 são hemoproteínas associadas a membranas principalmente do retículo endoplasmático. O nome P-450 vem de P para pigmento e 450 para o comprimento de onda 450 nm, onde a absorção de luz é máxima quando ligados a uma carbonila (CO) (Newman & Unger, 2003). Na membrana, as isoenzimas estão associadas ao NADPH citocromo P-450 redutase que transfere elétrons ao conjunto de isoenzimas. Estas substâncias e a membrana fosfolipídica formam a unidade responsável pela maior parte das oxidações da Fase I através da reação (Newman & Unger, 2003):



onde:

RH é um composto orgânico a ser hidroxilado e NADPH é nicotina-adenina-dinucleotídeo fosfato.

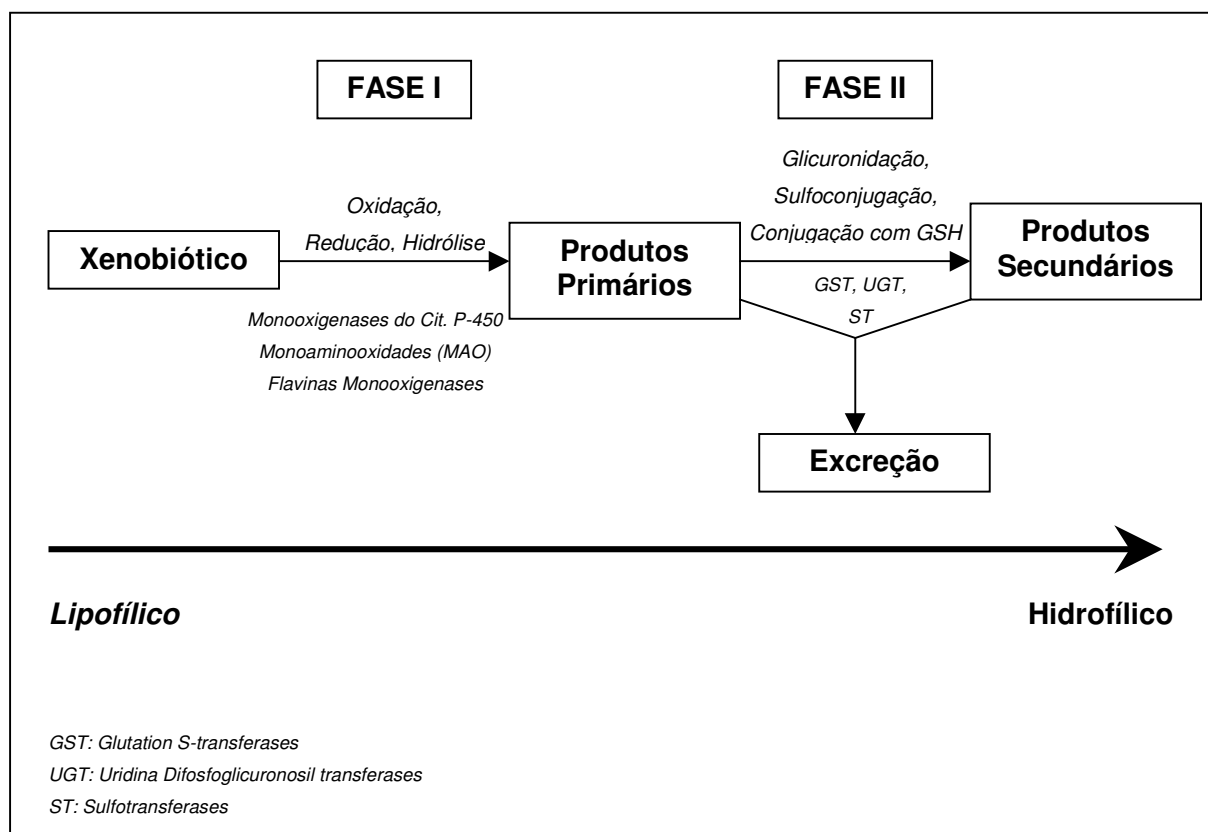


Figura 3. Esquema de biotransformação de xenobióticos (adaptado de Bastos, 2001).

Segundo Newman & Unger (2003) as monooxigenases do citocromo P-450 estão envolvidas no metabolismo de uma grande variedade de xenobióticos e também no metabolismo de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteróides. Mudanças bioquímicas associadas a indução do citocromo P-450 foram usadas por vários pesquisadores como biomarcadores na presença de contaminantes orgânicos tais como os HPAs (Eggens *et al.*, 1996; Camus *et al.*, 1998; Barra *et al.*, 2001; Jewett *et al.*, 2002).

As reações de hidrólise são catalisadas principalmente pelas epóxido hidrolases como também pelas peptidases e pelas A-estearases. As reduções são catalisadas por várias enzimas, dentre elas as carbonil redutases e as glutathione redutases, como também por processos não enzimáticos através de agentes redutores (Bastos, 2001).

A Fase II frequentemente envolve reações de conjugação na tentativa de neutralizar o xenobiótico. Estas reações de conjugação são catalisadas pelas glutathione S-transferases (GST), uridina difosfoglicuronosil transferases (UGT) e sulfotransferases (ST).

Além disso, em múltiplas reações metabólicas de transferência de elétrons em células aeróbicas são formadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas espécies reativas também podem resultar do metabolismo de certos xenobióticos e causam peroxidação de lipídios, alterações em proteínas e em ácidos nucleicos, produzindo danos às células. A proteção contra estas ERO é feita pelas enzimas superóxido dismutase, catalase, GST, glutathione peroxidase selênio-dependente, aldo-ceto redutase e enzimas de reparo do DNA.

Em geral, o aumento da polaridade da molécula leva à perda do potencial tóxico do composto sendo biotransformado, levando a desintoxicação. Porém, em alguns casos, pode ocorrer a ativação metabólica da molécula e o xenobiótico pode ser convertido em um produto com maior potencial tóxico (bioativação).

Atualmente, o mecanismo mais aceito para a ativação dos HPAs é a oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diolepóxidos (Figura 4). A ligação entre os diolepóxidos, resultantes da ativação metabólica destas substâncias, e o DNA é favorecida quando diolepóxidos vicinais são formados, principalmente nas moléculas não lineares, que contenham regiões de baía, como o benzo(a)pireno (Figura 5) (Pereira Netto *et al.*, 2000; Bastos, 2001; Hosnedl *et al.*, 2003).

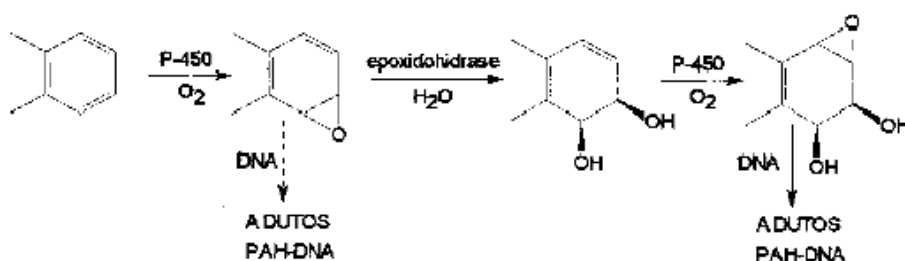


Figura 4. Mecanismo de ativação dos HPAs. (Adaptado de Pereira Netto *et al.*, 2000)

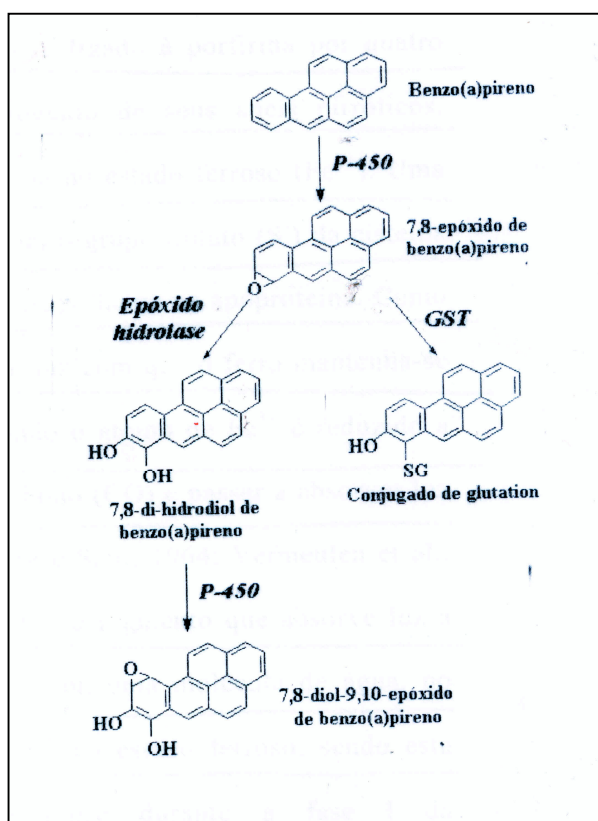


Figura 5. Representação esquemática simplificada do metabolismo do benzo[a]pireno.

3.2.1. O metabolismo do pireno

Como nesta dissertação o composto usado como referência é o pireno é importante conhecermos os metabólitos que são gerados na sua biotransformação. Apesar de não ser considerado tóxico, o pireno é muito usado como referência pela relativa simplicidade da sua biotransformação e por sua abundância no meio ambiente aquático.

O principal metabólito gerado na Fase I é o 1-hidroxipireno já que, por ser simétrica, a hidroxilação na molécula de pireno se dá preferencialmente nos átomos de carbono C-1, C-3, C-6 e C-8 (Figura 6) sendo o metabólito obtido em todos os casos chamado de 1-hidroxipireno (Luthe *et al.*, 2002). Na Fase II é formado principalmente o metabólito pireno-1-glucoronídeo (Bains & Kennedy, 2004) e em menor quantidade o pireno-1-sulfato que são então excretados na bÍlis dos peixes.

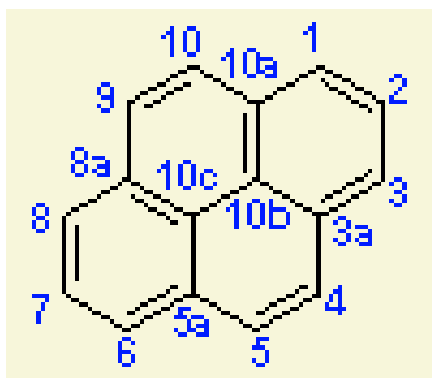


Figura 6. Estrutura do pireno.

3.3.

A bÍlis e a formação de biliverdina

3.3.1.

A bÍlis

Uma das funções do fÍgado  a formação de bÍlis. A bÍlis desempenha papel importante na digestão e absorção de gorduras, ajudando a emulsificar as grandes moléculas de gordura transformando-as em moléculas menores. Além disso, a bÍlis serve como meio de excreção de xenobióticos, entre outras substâncias (Guyton & Hall, 2002; Kierszenbaum, 2004).

A eliminação biliar de xenobióticos foi pouco estudada durante a primeira metade do século XX. A partir de 1950, com o aparecimento de uma grande variedade de substâncias químicas sintticas, foi reconhecida a importância da bÍlis como via de excreção destes compostos (Klaassen & Watkins, 1984).

A bÍlis  secretada pelos hepatócitos, células funcionais metabólicas do fÍgado. Esta secreção  formada por ácidos biliares, colesterol e outros constituintes orgânicos. Em seguida, a bÍlis flui pelos canalículos biliares (Figura 7) até atingir o ducto hepático e o colédoco, podendo ser liberada diretamente no duodeno e principalmente desviada para a vesícula biliar (Guyton & Hall, 2002).

Segundo os autores *op citem*, a bÍlis inicial recebe uma segunda secreção aquosa de íons sódio e bicarbonato a fim de neutralizar o ácido proveniente do estômago que deságua no duodeno. Em condições normais esta se encontra concentrada na vesícula biliar por cerca de cinco vezes, podendo chegar a um máximo de 20 vezes.

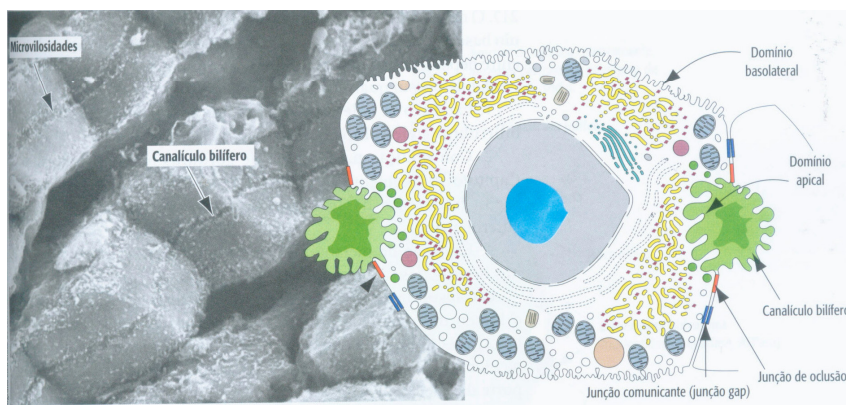


Figura 7. canaliculo bilífero (Kierszenbaum, 2004).

A bÍlis é formada basicamente de água (~97%) e sais biliares (1-2%), quando secretada pelo fÍgado. Na vesÍcula biliar o conteÍdo de água diminuiu para 87% como resultado de sua concentraÍão. São encontradas outras substâncias tais como os pigmentos biliares, biliverdina e bilirrubina, substâncias derivadas da degradaÍo da hemoglobina, além de metabólitos de xenobióticos.

Quando o peixe se alimenta, o inÍcio da digestão na porÍo superior do trato gastrintestinal leva ao esvaziamento da vesÍcula biliar, sobretudo quando alimentos gordurosos chegam ao duodeno. Acredita-se que ao esvaziar a mesma se encha rapidamente de água, diminuindo a concentraÍo de xenobióticos presentes (Richardson *et al.*, 2004).

Dessa forma, um peixe que passe maior perÍodo de tempo sem se alimentar terá maior quantidade de metabólitos de HPAs sulfatados e glicuronidados na vesÍcula biliar (Beyer *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, maior concentraÍo de HPAs na bÍlis, quando comparado a outro recém alimentado.

As quantidades de biliverdina e de proteÍna biliar, indicativos de densidade da bÍlis, podem ser utilizadas como indicadores da situaÍo (*status*) alimentar do peixe.

3.3.2. A formaÍo de biliverdina

A principal funÍo dos eritrócitos (hemácias) consiste em transportar hemoglobina, esta é responsável pelo transporte de oxignio para os tecidos.

Quando a membrana eritrocitária dos eritrócitos se torna frágil, as células se rompem durante sua passagem por algum ponto estreito da circulação, liberando a hemoglobina que é quase imediatamente fagocitada por macrófagos do sistema reticuloendotelial. Isto ocorre em muitas partes do organismo porém, particularmente pelas células de Kupffer do fígado e por macrófagos no baço e na medula óssea, liberando globina e heme (Guyton & Hall, 2002).

O anel heme é oxidado a α -meso-hidroxieme, que no estado desprotonado tem características de radical livre, reagindo com oxigênio para produzir verdoheme e carbonila (Figura 8). A verdoheme é então, convertida a biliverdina e ferro livre em uma reação que requer um NADPH-citocromo P-450-redutase e O_2 . A liberação da biliverdina é uma etapa lenta, mas que pode ser acelerada na presença de biliverdina redutase, enzima que converte a biliverdina em bilirrubina (Montellano, 2000), sendo então, gradualmente liberada no plasma pelos macrófagos (Guyton & Hall, 2002).

A biliverdina é responsável pela pigmentação característica de alguns peixes, anfíbios, répteis e insetos e pela coloração da casta do ovo de alguns pássaros (Colleran & Heirwegh, 1979).

Em mamíferos os pigmentos biliares não parecem ter nenhum papel funcional claro. Eles aparentemente servem como produtos finais do catabolismo da heme da hemoglobina, destinados à rápida excreção.

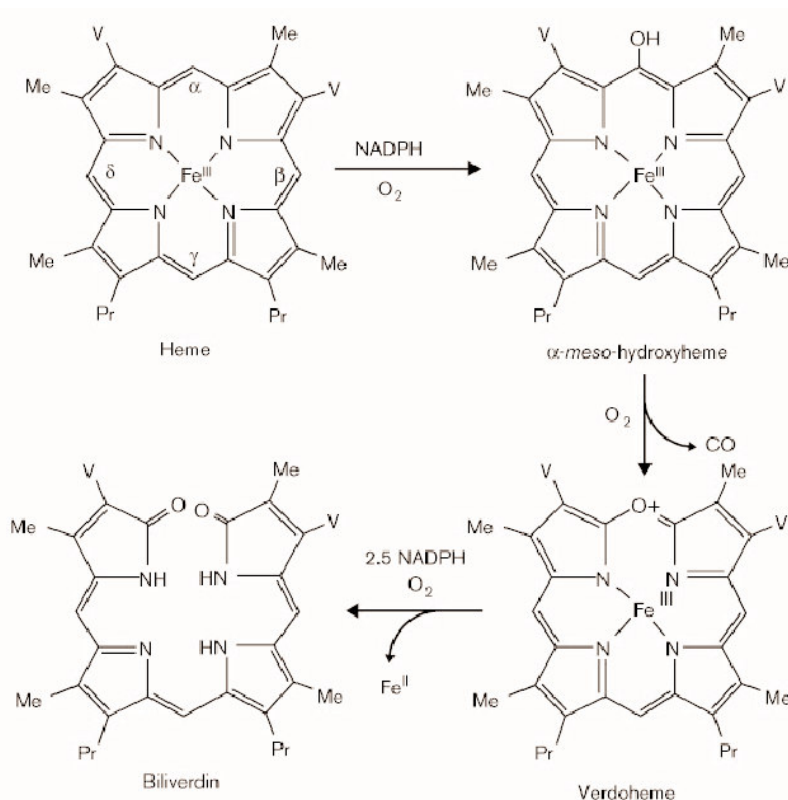


Figura 8. Oxidação do anel heme até a formação de biliverdina.