



AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ATIVIDADE DE CATALASE NO ENCÉFALO DE PAULISTINHAS ADULTOS

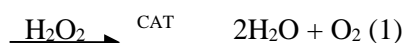
Gabriel Rocha Felício,
Bruna Patrícia Dutra da Costa,
Diógenes Henrique Siqueira da Silva,
Caio Maximino de Oliveira

Agência Financiadora: CNPQ/UNIFESSPA

Área: Bioquímica

1. INTRODUÇÃO

A catalase é uma enzima tetramérica encontrada em todos os organismos vivos. Por possuir uma ampla distribuição e por sua característica de degradar de forma acelerada o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (Equação 1), é uma enzima chave para remover o peróxido de hidrogênio e evitar a formação de radicais hidroxil ($OH\cdot$) (Regoli et al. 2000).



O *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha ou zebrafish, é um peixe teleósteo que vive em água doce, e tem sido nos últimos anos utilizado como modelo experimental nas mais diversificadas área de pesquisa. Sua utilização tão crescente se deve ao seu pequeno porte, facilidade de manejo, e por possuir uma reprodução bastante simples de ser realizada em laboratório, e ampla homologia genética com mamíferos (Briggs, 2002). Existem alguns ensaios para avaliação do estresse oxidativo em *D. rerio*; entretanto, não se encontram na literatura métodos otimizados para avaliação da atividade enzimática da catalase nessa espécie. Na presente pesquisa o *Danio rerio* será utilizado como modelo biológico para avaliação e quantificação da atividade da enzima catalase no cérebro e rim-cefálico, padronizando um protocolo para essa enzima em sistemas biológicos. Além da validação analítica de ensaio espectrofotométrico para catalase em *D. rerio*, a presente pesquisa também apresenta, a título de prova-de-conceito, a utilização do método proposto para avaliar o efeito da abstinência etanólica na atividade da catalase nesses tecidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de avaliação da atividade de catalase no encéfalo do Zebrafish *Danio rerio* foram conduzidos com base no trabalho de Aebi 1984 (METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 105, PAG. 121-126). O substrato peróxido de hidrogênio 35% (Marca Neon) foi diluído em tampão fosfato 50 mM (pH 7,5) para os ensaios.

A validação analítica foi realizada através de curva de linearidade, com sete concentrações decrescentes (0,02 – 1,13 M) de H_2O_2 diluídas em tampão. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Marca Bel UV-M51 UV-VISÍVEL), com filtro em 240 nm. A linearidade foi estabelecida através de regressão linear, com r^2 superior a 0,98 considerado como aceitável. A curva foi estabelecida com três replicatas técnicas. Após determinação de linearidade, a precisão e a repetibilidade do método foram estabelecidas através da quantificação com três concentrações conhecidas (1,13, 0,14, e 0,02 M), com medidas repetidas a cada 1 h, em triplicata técnica. A repetibilidade intra-laboratorial (precisão intermediária) foi estabelecida a partir da Equação 2.

$$HORRAT_r = \frac{RSD}{PRSD}$$

Onde RSD representa o desvio-padrão relativo observado (=100xdesvio-padrão/média), e PRSD representa o desvio-padrão relativo calculado (=concentração^{-0,15}). Valores de HORRAT entre 0,3 e 1,3 foram considerados aceitáveis.

Estabelecidos os padrões analíticos, avaliou-se o efeito da abstinência etanólica na atividade da catalase em encéfalo e rim cefálico de animais experimentais. Os animais ($n = 14/\text{grupo}$) foram acondicionados em aquários contendo 3 litros de água, divididos em 2 grupos: um grupo de abstinência alcoólica, expostos a concentrações cumulativas de álcool etílico (EtOH, 0 a 0.25%) por 16 dias; e um grupo controle, exposto a H₂O. Ambos os grupos foram expostos às mesmas rotinas de alimentação e exposição a EtOH ou H₂O (9:30 AM), e alimentação à tarde (6:00 PM).

Após o período de 16 dias os animais experimentais foram expostos a abstinência por 60 min (retirada da água com EtOH ou H₂O, e exposição a H₂O). Após esse período, os animais foram sacrificados, e dissecados para a retirada do cérebro e rim-cefálico com o auxílio de estereoscópio (Marca Optika). Posteriormente à retirada dos órgãos, as amostras foram devidamente identificadas e homogeneizadas em tampão fosfato. Imediatamente após adição de H₂O₂ 10 mM (1:1), as amostras foram analisadas em espectrofotômetro; a diminuição na absorbância em segunda mensuração após 30 s foi definida como atividade de catalase, segundo a equação 3:

$$k = \left(\frac{2.3}{\Delta t}\right) \left(\log \frac{A_1}{A_2}\right) (\text{sec}^{-1})$$

Os ensaios foram realizados em triplicata técnica, e a média das absorbâncias foi utilizada para determinação da atividade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados da validação analítica.

Parâmetro estatístico	Valor
Faixa de concentração (M)	0,01769 – 1,132133
Coefficiente angular	0,819263690296253
Coefficiente linear	0,004781788303864
Coefficiente de determinação (R ²)	0,9849
Repetibilidade intermediária (HORRAT _r) média ± IC (95%)	0,2364 ± 0,2322

Os resultados da validação analítica apresentam boa aderência a padrões típicos para ensaios espectrofotométricos no espectro ultravioleta, com boa linearidade e repetibilidade.

A abstinência etanólica não alterou a atividade de catalase no rim cefálico dos animais (teste aproximativo de permutação de Fisher-Pitman: $Z = -0,47$, $p = 0,65$), mas houve aumento na atividade de catalase do encéfalo dos animais ($Z = -1,997$, $p = 0,046$). Esses resultados diferem em direção do reportado na literatura, que observaram diminuição na atividade da catalase após exposição crônica ao etanol por 8 d e retirada por 24 h. Naquele artigo, entretanto, o método de exposição ao etanol, a duração da exposição, e a duração da retirada foram diferentes dos métodos utilizados aqui.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Consideramos que o objetivo de padronização do protocolo *in house* para análise da atividade enzimática da catalase foi alcançado, e que a análise do efeito da abstinência alcoólica na atividade da catalase em encéfalo de paulistinhas adultos mostrou que a abstinência alcoólica proporciona uma alteração significativa em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105 (13), 121-126, 1984.
- Briggs, J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282 (1), 3-9, 2002.

Regoli, F., Nigro, M., Bompadre, S., Winston, G. W. Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants. *Aquatic Toxicology*, 49 (1), 13-25, 2000.