

## ANÁLISES CITOTÓXICAS EM CÉLULAS BRANQUIAIS DE *Astyanaxmexicanus* EXPOSTAS AO METILMERCÚRIO

Erika Fernanda de Matos Vieira<sup>1</sup>

Lygia Segá Nogueira<sup>2,3</sup>

Carolina Pinheiro Vasconcelos<sup>3,4</sup>

Roberto Ferreira Artoni<sup>5</sup>

Edivaldo Herculano Correa de Oliveira<sup>1,3</sup>

### Saúde, Segurança e Meio Ambiente

#### RESUMO

O mercúrio é considerado um metal tóxico com concentrações relativamente altas nos corpos d'água da Bacia Amazônica. Quando disponível no meio aquático, este metal se biotransforma em metilmercúrio (MeHg) e torna-se ainda mais tóxico para os organismos aquáticos, sofrendo bioacumulação e biomagnificação, atingindo a população humana especialmente por consumo de peixe contaminado. Pouco se sabe sobre alterações causadas por esse composto em tecidos de peixes. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar alterações celulares causadas pela exposição ao MeHg *in vitro* em culturas primárias de células branquiais de *Astyanaxmexicanus*. As células foram expostas a diferentes concentrações de MeHg (0,5, 1,25, 2,5, 3,5 e 5 µM), e posteriormente submetidas a testes de viabilidade celular e metabolismo celular. Os resultados demonstraram que não houve alterações nesses parâmetros após a exposição às concentrações 0,5, 1,25 e 2,5 µM. Na concentração de 3,5 µM as análises demonstraram uma queda significativa do número de células viáveis e de atividade metabólica, sendo que em 5 µM foi observado 100% de morte celular. Esses resultados confirmam o poder desse metal em se acumular na cadeia alimentar, sem aparentemente causar grandes alterações em doses subletais, e assim potencializando sua ingestão pelo homem, causando diversas alterações clínicas já bem documentadas na ciência.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade; MTT; Viabilidade celular.

#### INTRODUÇÃO

A toxicologia define-se como o ramo da ciência que compreende os efeitos adversos dos agentes químicos e físicos em organismos vivos. Os testes de toxicidade mostram-se de suma relevância ao analisar o potencial de risco ambiental, sobretudo, ao considerar-se que

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências e Meio Ambiente, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Pará

<sup>3</sup> Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas

<sup>4</sup> PIBIC, Universidade Federal do Pará

<sup>5</sup> Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

somente as análises químicas tradicionalmente realizadas não são capazes de abranger os efeitos dessas substâncias sobre sistemas biológicos (COSTA et al., 2008).

Na Amazônia, um dos principais poluentes encontrados no ambiente aquático é o mercúrio. O mercúrio é considerado altamente tóxico e detém propriedades bioacumulativas e de biomagnificação, fomentando numerosos estudos direcionados à sua distribuição no meio aquático. É também no meio aquático que este metal é biotransformado em metilmercúrio (MeHg), sua espécie química de maior toxicidade para os organismos vivos e também mais frequente em incidentes por contaminação ambiental (JAISHANKAR, 2014; HONG; KIM; LEE, 2012).

Apesar de sua conhecida toxicidade para organismos aquáticos, pouco se sabe sobre as alterações causadas pelo MeHg a nível celular em organismos que representam a principal rota de contaminação humana por ingestão: os peixes (OKPALA et al., 2017). Estudos da ação de doses subletais de MeHg em organismos aquáticos auxiliarão no melhor entendimento do processo de bioacumulação e biomagnificação na biota aquática.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo fazer uma análise toxicológica de células branquiais de peixes à exposição a diferentes concentrações de MeHg *in vitro*. Para isso, foram utilizadas culturas primárias brânquias da espécie *Astyanax mexicanus*, espécie com amplo destaque em estudos com enfoque na genética evolutiva e distribuído comercialmente como espécie ornamental (FAO, 2018). Já as brânquias são consideradas órgãos-alvo para estudos ecotoxicológicos em vertebrados aquáticos (excluindo-se mamíferos) e invertebrados, uma vez que são responsáveis por funções fisiológicas vitais nestes organismos, além de estar em contato direto com o meio aquático e assim, com toda contaminação nela encontrada (GIULIO; NEWMAN, 2012).

## **METODOLOGIA**

**Cultivo Celular:** Biopsias foram coletadas no Laboratório de Genética Evolutiva (UEPG), conforme metodologia aprovada pela autorização 04509/08 do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, e enviados ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas para estabelecimento de culturas primárias. As células foram dissociadas enzimaticamente e cultivadas em garrafas de cultura celular usando meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. As culturas foram mantidas a 27°C.

Exposição ao Metilmercúrio: Cultura primária de células branquiais de *A. mexicanus* foram semeadas em placas de cultivo celular, e após sua aderência (~24h) foram iniciadas as exposições ao MeHg nas concentrações de 0,5, 1,25, 2,5, 3 e 5  $\mu\text{M}$ . Após 24h de exposição, as células foram analisadas nas metodologias descritas posteriormente.

Viabilidade celular: Estimou-se o número de células viáveis e não viáveis com o uso do corante azul de Trypannas diferentes concentrações de MeHg. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

Metabolismo Celular: Após 24 horas de exposição ao MeHg, o meio de exposição foi retirado e adicionou-se uma solução contendo MTT (4,5 dimethylthiazol-3,5-diphenyltetrazolium), incubando-se posteriormente por 2 horas, à 27°C. Ao final da incubação, o MTT foi retirado e o DMSO adicionado afim de diluir os cristais de formazan formados na reação. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

Análise Estatística: Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre grupos experimentais nas análises de metabolismo e viabilidade celular foram realizados através da ANOVA de uma via, respeitando-se os pressupostos de normalidade e considerando nível de significância em 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

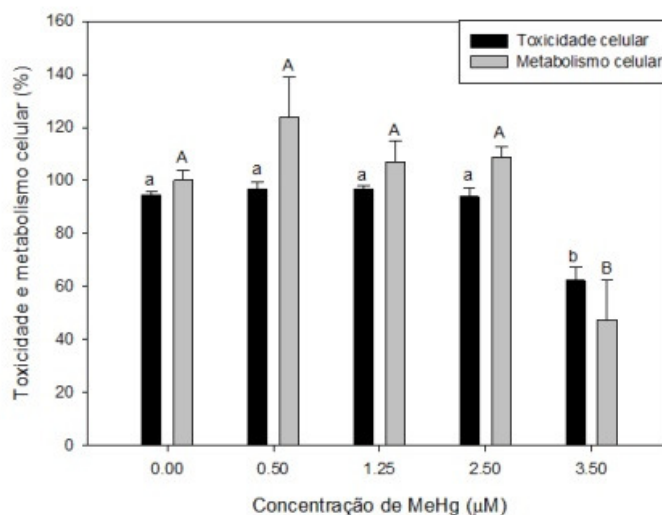
A viabilidade celular analisada pelo método do Azul de Trypan demonstra que a toxicidade do metilmercúrio ocorreu a partir da concentração de 3,5  $\mu\text{M}$ , com diminuição significativa na porcentagem de células viáveis ( $62,1 \pm 5,1\%$ ) em relação ao controle (100%). Nos tratamentos de 0,5, 1,25 e 2,5  $\mu\text{M}$  os valores de viabilidade celular ( $96,4 \pm 2,8$ ,  $96,6 \pm 1,2$ ,  $93,8 \pm 3,0$ ) não diferem do controle ( $94,3 \pm 1,5$ ). Por fim, a exposição ao MeHg na concentração de 5  $\mu\text{M}$  foi extremamente tóxica, causando morte das células (Figura 1). Através desses resultados, foi possível calcular a LC50 (concentração letal para 50% da população) através do método de Probitos, resultando em um valor de 3,29  $\mu\text{M}$  MeHg.

Os resultados encontrados por Filipak Neto et al. (2008) indicam uma diminuição na viabilidade celular de hepatócitos da traíra (*Hoplias malabaricus*) após exposição ao MeHg (90,0) na concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ , apresentando-se estatisticamente significativa (77,0) a partir de 2,5  $\mu\text{M}$ , valor superior ao observado de decaimento de viabilidade para *A. mexicanus* (93,8

$\pm 3,0$ ) na mesma concentração de  $2,5 \mu\text{M}$ . Portanto, em função da morte celular e da concentração da exposição, constata-se que suas células branquiais de *A. mexicanus*, nestas condições, apresentam menor sensibilidade ao MeHg que a células de tecido hepático.

A análise de metabolismo celular (teste de MTT) demonstrou sua diminuição significativa na concentração de  $3,5 \mu\text{M}$  MeHg ( $47,2 \pm 14,9\%$ ). No restante dos grupos testados ( $0,5$ ,  $1,25$  e  $2,5 \mu\text{M}$ ), os valores de metabolismo celular ( $123,6 \pm 15,2$ ,  $106,9 \pm 8,1$ ,  $108,7 \pm 3,8\%$ , respectivamente) não foram diferentes significativamente do controle ( $99,9 \pm 3,7\%$ ; Figura 1).

Figura 1. Toxicidade e metabolismo celular da cultura primária branquial de *A. mexicanus* expostas a diferentes concentrações de MeHg. Letras maiúsculas e minúsculas diferem com relação as análises. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



De acordo com o index calculado através da razão entre o metabolismo celular e viabilidade celular, a cultura primária de *A. mexicanus* manteve-se inalterada em função dos aumentos das concentrações de MeHg (Figura 2). Lee et al. (2012), ao abordar análises histológicas de brânquias de duas espécies de peixes expostas à MeHg ( $0$ ,  $25$ ,  $50$ ,  $100 \text{ mg/kg}$  de dieta por 8 semanas), observaram a formação de lesões branquiais a partir da concentração de  $50 \text{ mg/kg}$  as quais podem interferir em sua eficiência metabólica, aumentando sua demanda energética do organismo.

Figura 2. Index proveniente da razão entre o metabolismo celular e viabilidade celular em cultura primária branquial de *A. mexicanus* exposta ao MeHg. Letras iguais representam ausência de diferença estatística. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

	0 $\mu\text{M}$ <u>MeHg</u>	0,5 $\mu\text{M}$ <u>MeHg</u>	1,25 $\mu\text{M}$ <u>MeHg</u>	2,5 $\mu\text{M}$ <u>MeHg</u>	3,5 $\mu\text{M}$ <u>MeHg</u>
<b>Index</b>	1,05 $\pm$ 0,01 <sub>a</sub>	1,28 $\pm$ 0,12 <sub>a</sub>	1,10 $\pm$ 0,09 <sub>a</sub>	1,15 $\pm$ 0,01 <sub>a</sub>	0,93 $\pm$ 0,16 <sub>a</sub>

## CONCLUSÕES

O fato das análises de viabilidade e metabolismo celular demonstrarem que a exposição ao MeHg induziu efeitos citotóxicos nas células branquiais de *A. mexicanusa* somente a partir de concentrações de 3,5  $\mu\text{M}$  confirmam a capacidade de bioacumulação desse composto na cadeia alimentar quando os organismos são expostos a doses subletais, e potencializando sua ingestão pelo homem, no qual causadas diversas alterações já bem documentadas pela ciência. Análises preliminares demonstram que essa toxicidade é causada quando há um aumento intracelular de mercúrio, indicando a importância da análise da concentração desse poluente em organismos utilizados pela população na alimentação, em áreas com conhecida poluição por MeHg.

## REFERÊNCIAS

- COSTA, Carla Regina et al. A Toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**: Fisheries and Aquaculture Department. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/introsp/8660/en>>. Acesso em: 09 jul. 2018.
- FILIPAK NETO, F. et al. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p.1705-1713, 2008.
- GIULIO, Richard T. di; NEWMAN, Michael C.. Ecotoxicologia. In: KLAASSEN, Curtis D; III, John B Watkins. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. New York: Abgh Editora Ltda, 2012. Cap. 29. p. 391-399.
- HONG, Young-seoub; KIM, Yu-mi; LEE, Kyung-eun. Methylmercury Exposure and Health Effects. **J Prev Med Public Health**, v. 45, n. 6, p.353-363, 2012.
- JAISHANKAR, Monisha et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdiscip Toxicol.**, v. 7, n. 2, p.60-72, 2014.
- LEE, Jang-won et al. Histopathological alterations of juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) exposed to graded levels of dietary methylmercury. **Aquatic Toxicology**, v. 109, p.90-99, 2012.
- OKPALA, Charles Odilichukwu R. et al. Hazardous properties and toxicological update of mercury: From fish food to human health safety perspective. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 10, p.1-16, 2017.