



EFEITOS CELULARES DE CONTAMINANTES EMERGENTES EM *Danio Rerio* E *Allium Cepa*: RESULTADOS PRELIMINARES.

**GABRIELLE DOS SANTOS BIANCO^{1,2}, CAMILA FERNANDA ZORZO^{1,3},
GIOVANA LAÍS ECKERT^{1,4}, MARCELLA SCHNEIDER BRUN CAMPOS^{1,3},
SUZYMEIRE BARONI^{1,5}**

1 Introdução

A humanidade tem sido exposta a uma quantidade considerável de produtos químicos já que o uso desses tem aumentado muito nos últimos anos. Calcula-se que sejam conhecidos mais de 11 milhões de produtos conhecidos, sem contar os que estão em processo de obtenção nos próximos anos. Desses químicos há uma categoria que tem trazido preocupação, os chamados disruptores endócrinos, que tem sido alvo de muitas pesquisas e interesse médico (RHIND, 2002; CHEN, 2001; MENDITTO & TURRIO-BALDASSARRI, 1999).

Os compostos denominados Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) têm potencial para interagir com várias rotas endócrinas de organismos além de interferirem na síntese de vários hormônios. Ainda podem agir como mimetizadores hormonais, xenoestrógenos além de indutores de eventos epigenéticos (ROTHELL and OSTRANDER, 2003 COLBORN, VOM SAAL and SOTO, 1993).

Processos avançados de tratamento que são capazes de degradar e / ou mineralizar os contaminantes se tornam uma alternativa de pré-tratamento importante para redução da toxicidade e recalcitrância desses compostos como o processo Photo-Electro-Fenton e com UV-solar/H₂O₂ (NAVEEN ET AL., 2017; RENOU ET AL., 2008).

Com a finalidade de estudar a ação dos xenobióticos têm sido utilizados biomarcadores, que é qualquer organismo que apresente mudança biológica em resposta a um elemento ou substância química presente no ambiente (MOREIRA ET AL., 2010; AL-SABTI E METCALFE, 1995; MATSUMOTO E COLUS, 2000; GRISOLIA 2005).

O peixe *Danio rerio*, conhecido como Zebrafish, é um modelo genético já utilizado para pesquisas biológicas. Isso se deve a sua boa tolerância a variações ambientais, fácil reprodução em aquários e devido a inúmeras características como o sequenciamento completo do seu genoma, que se assemelha aos demais vertebrados, incluindo os seres humanos em aproximadamente 70% (BENITES et al. 2014). Desta forma o uso desse organismo é válido para avaliar impacto genotóxico e citotóxico de xenobióticos. A frequência de micronúcleo

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul-Cerro Largo-RS

² Bolsista IC-UFFS

³ Aluna do Programa de Pós-Graduação de Ambientes e Tecnologias Sustentáveis

⁴ IC-UFFS Voluntária.

⁵ Orientadora e professora permanente do Programa de Pós-Graduação de Ambientes e Tecnologias Sustentáveis



(MN) observada em um determinado momento em eritrócitos pode ser considerada uma resposta complexa entre atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo (MERSCH et al., 1996)

Um outro teste igualmente válido e de fácil execução é o teste com *Allium cepa*. Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade utilizando o bioensaio com *Allium cepa* têm sido amplamente usados a fim de avaliar substâncias que podem alterar os processos celulares alterando o ciclo celular interferindo na integridade do DNA em eucariotos (RANK E NIELSEN, 1993).

Desta forma, esse projeto se propôs avaliar danos genotóxicos, citotóxicos em peixes e células meristemáticas submetidos a tratamentos em concentrações padronizadas de subprodutos de EDGs submetidos ao sistema de Peroxidação/UV.

2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é determinar erros celulares em eucariotos superiores submetidos a exposição de contaminantes emergentes padrões de genotoxicidade.

3 Metodologia

O trabalho foi aprovado pela CEUA/UFFS sob o protocolo de número: nº 1010191119.

Peixes com tamanho pequeno (ainda juvenis) foram mantidos no aquário até atingirem tamanho ideal para os testes e foram alimentados diariamente. No primeiro teste foi utilizado o composto BPA (Bisfenol) sob quatro condições submetidos ao processo oxidativo com Peróxido de Hidrogênio em dois diferentes pHs (pH 3 e pH 5), sendo assim determinados: BPA em concentração de 25mg/L; Peróxido de Hidrogênio 350mg/L e TpH3 e TpH5. Para cada tratamento foram usados três exemplares de *Zebrafish*, bem como também foram alocados o controle negativo e um controle positivo em Nitrato de Chumbo 05% com três peixes cada.

Depois dos testes, foram confeccionadas lâminas por esfregação de sangue e corados pelo método de Feulgen. Foram contabilizadas 2.000 células por peixes para avaliar presença de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN) e analisadas em Microscópio Óptico em 100X.

Os dados serão submetidos em teste estatístico para nível de significância de 0,5%.

*Os testes com *Allium cepa* estão em andamento com contagem de células.

4 Resultados e Discussão

Os resultados preliminares com os dados dos micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN) estão dispostos na Tabela 1.

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul-Cerro Largo-RS

² Bolsista IC-UFFS

³ Aluna do Programa de Pós-Graduação de Ambientes e Tecnologias Sustentáveis

⁴ IC-UFFS Voluntária.

⁵ Orientadora e professora permanente do Programa de Pós-Graduação de Ambientes e Tecnologias Sustentáveis



Os peixes expostos à amostra que continha somente o componente BPA 25mg/L (sem passar pelo processo) morreram em menos de 4h indicando que a amostra se mostra bastante tóxica. Os peixes apresentaram comportamento aleatório, com perda de controle de nado e equilíbrio, sugerindo que o BPA teve efeito sobre o Sistema Nervoso Central. Por se tratar de uma substância lipofílica e ter a capacidade de passar pelas barreiras hematoencefálicas o BPA tem sido associado a múltiplos distúrbios neuropsicológicos e distúrbios neurocomportamentais (KARLSGODT et al., 2008).

A amostra que continha o Peróxido de Hidrogênio 350 mg/L também ocasionou a morte dos peixes em menos de 4h. A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções relevantes no organismo (FERREIRA, et al.,1997). O peróxido reage com membranas celulares induzindo oxidação e perda de funcionalidade da decorrência da peroxidação lipídica acarretando alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, com perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos levando a morte celular (MELLO, et al., 1983; HERSHKO,1989).

O grupo de pesquisa que nos cedeu as amostras para os testes, passaram os produtos TpH3 e TpH5 no Espectrômetro Gasoso de Massa (GC-MS) e constataram a persistência de bisfenol nas amostras resultantes do processo, o que promoveu aumento considerável de micronúcleo (MN) nos peixes que foram submetidos às essas amostras como está mostrado na tabela 1.

Durante as 96h de exposição, o BPA teve ação importante nos eventos celulares induzindo erros nos processos de divisão celular promovendo o surgimento de micronúcleo (MN) bem como alterando as vias de reparo. Recentemente, Mu e colaboradores (2018), em seus estudos demonstraram o efeito citotóxico do BPA em macrófagos da linhagem RAW264.7. Observaram que BPA foi capaz de induzir processos de necrose, apoptose, genotoxicidade, fosforilação de p53 e liberação de citocromo C além de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos. Estes resultados indicaram que o efeito tóxico do BPA estava atuando via oxidativa e via apoptótica mitocondrial associada ao estresse em macrófagos (MU et al., 2018).

Nota-se na tabela 1 que, à medida que aumenta a incidência de micronúcleo (MN), diminui o número de células com anormalidades nucleares (AN), isso pode sugerir que as vias de reparo não foram capazes de minimizar os erros induzidos pelo BPA aumentando assim a quantidade de células com micronúcleo (MN). Sabemos que o estabelecimento de

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul-Cerro Largo-RS

² Bolsista IC-UFFS

³ Aluna do Programa de Pós-Graduação de Ambientes e Tecnologias Sustentáveis

⁴ IC-UFFS Voluntária.

⁵ Orientadora e professora permanente do Programa de Pós-Graduação de Ambientes e Tecnologias Sustentáveis



micronúcleo (MN) numa célula é irreparável e, portanto, parte desse material genético perdido não tem como ser realocado no núcleo, alterando assim a expressão gênica e integridade nas transcrições. Os efeitos prejudiciais do BPA vão além de sua aptidão para alterar o sistema endócrino, e tem sido apontado como capaz de modificar a estrutura do DNA e a expressão gênica o que lhe confere também um efeito epigenético (BERNARDO et al., 2015).

4 Conclusão

Esse trabalho ainda está em andamento com coleta de dados no organismo *Allium cepa*, mas os dados preliminares sugerem que o BPA é uma molécula difícil de ser retirada de uma dada solução e seus efeitos clastogênicos sobre células de eucariotos atuam mesmo em pequenas concentrações.

Tabela 1. Números de células com micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN) em 6000 células de eritrócitos de *Danio rerio* submetidos às amostras advindas do processo de UV-solar/H₂O₂ para degradação do EDC Bisfenol (BPA) sob diferentes pHs: pH 3,0 e pH 5,0.

Amostras	MN	AN
Água destilada	0	2349
Controle Positivo Pb(NO ₃) ₂ 0,5%	12	2013
BPA=25mg/L pH=3	22	1170
BPA=25mg/L pH=5	16	636
BPA 25mg/L*	Morte de todos os peixes em menos de 4 horas	
Peróxido 350mg/L		

*amostra sem tratamento UV-solar/H₂O₂

Referências

- BERNARDO, PAULO EDUARDO MASSELLI; NAVAS, S. A.; TIECO, L.; MURATA, F.; ALCÂNTARA, M. R. DA S. Bisphenol A: Review on its use in the food packaging, exposure and toxicity. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 1–11, 2015.
- BENITES, Leonardo Munhoz et al. Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do Rio Uruguai. **Ciência e Natura**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 107-113, 31 jul. 2014.
- MU, X.; HUANG, Y.; LI, XUXING; LEI, Y.; TENG, M.; LI, XUEFENG; WANG, C.; LI, Y. Developmental Effects and Estrogenicity of Bisphenol A Alternatives in a Zebrafish Embryo Model. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 3222– 3231, 2018.

Palavras-chave: Micronúcleo. Genotoxicidade. Bisfenol. *Zebrafish*.

Financiamento ICT/UFFS

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul-Cerro Largo-RS

² Bolsista IC-UFFS

³ Aluna do Programa de Pós-Graduação de Ambientes e Tecnologias Sustentáveis

⁴ IC-UFFS Voluntária.

⁵ Orientadora e professora permanente do Programa de Pós-Graduação de Ambientes e Tecnologias Sustentáveis