

AValiação Citotóxica e Genotóxica do Alumínio em Células de Ovário de Hamster

Syla Maria F. F. Klafke^{1*}, Luiza Flávia F. Veiga², Débora da S. Baldivia³, João Vitor F. Silva¹, Bruno do A. Crispim, Edson Lucas dos Santos⁵, Alexeia B. Grisolia⁶.

1. Estudante da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA-UFGD)
2. Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFGD
3. Estudante do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró-Centro-Oeste
4. Estudante do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Bioprospecção da UFGD
5. Docente do curso de Biotecnologia e Ciência Biológicas da UFGD
6. Docente do curso de Biotecnologia e Ciência Biológicas da UFGD - Orientadora

Resumo

Análises em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano em Itaporã-MS, identificaram concentrações de Al em desconformidade com a Legislação (0,4-0,7 mg/L). A exposição em níveis acima do permitido pela Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (0,2 mg/L), pode representar riscos para a saúde humana e meio ambiente. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade das concentrações do Al em valores similares e superiores ao da legislação vigente em células de ovário de Hamster Chinês (CHO). Células de CHO foram expostas *in vitro* à diferentes concentrações de Al. A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio com MTT e, a genotoxicidade pelo teste do micronúcleo (MCN) e anormalidades nucleares. A análise estatística foi realizada utilizando Kruskal-Wallis para dados não paramétricos e ANOVA para paramétricos. Os resultados para o teste do MTT, permitiram observar que não houve diferença significativa entre os períodos. Na análise de brotamentos, observou-se que a partir de 48h de exposição, todas as concentrações se diferiram do CN. Para os resultados da formação de ponte nuclear, não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos. Para o teste de micronúcleo, foi possível observar que a maior concentração (2mg/L) apresentou diferença significativa em todos os tratamentos com o CN. No período de 72h foi observado diferença significativa com o CN a partir da concentração de 0,6mg/L. Para a análise de genotoxicidade foi observado diferença significativa para brotamento a partir da concentração de 0,2 mg/L e para micronúcleo a partir da concentração de 0,6mg/L. Tais resultados demonstram a potencialidade do Al em causar citotoxicidade e em induzir danos nas células de CHO *in vitro*. Os resultados indicam que o valor máximo permitido pela legislação ocasiona danos às células de CHO. Assim sendo, as concentrações de Al encontrados na água de Itaporã em desconformidade com a legislação podem também causar danos à célula. Com isso, torna-se importante realizar ensaios biológicos em células humanas a fim de investigar efeitos causados pelo Al nas mesmas.

Palavras-chave: CHO, metal, ensaio *in vitro*.

Apoio financeiro: UFGD, CAPES e FUNDECT.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFGD

Introdução

O alumínio (Al) é o terceiro elemento metálico mais encontrado na crosta terrestre e o mais abundante entre todos os demais elementos. Desta forma, sua biodisponibilidade no ambiente pode ser alta, decorrente do descarte de resíduos gerados pelas atividades antropogênicas, como, industriais, agrícolas e domésticas. Essa contaminação muitas vezes está associada à presença de contaminantes químicos não biodegradáveis que podem ser tóxicos para seres vivos (Silva, 2013). De acordo com a portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, água potável é definida como aquela destinada ao consumo humano cujos parâmetros microbiológicos,

físicos, químicos e radioativos atendam o padrão estabelecido de potabilidade e não ofereça risco à saúde humana. Para o metal alumínio, o valor máximo permitido pela legislação para águas subterrâneas destinadas ao consumo humano é de 0,2 mg/L. Estudos realizados por Grisolia (2015), em poços na cidade de Itaporã, no estado do Mato Grosso do Sul, destinados ao consumo humano, verificou que o Al se encontrava com valor acima do permitido pela portaria nº 2914/2011.

Os efeitos negativos do Al a longo prazo como pode representar riscos para a saúde tanto dos seres humanos como dos animais devido à sua toxicidade e particularmente à sua neurotoxicidade (Verstraeten et al., 2008). Muitos dos efeitos causados pelo Al são desconhecidos, bem como a sua interferência nos processos biológicos. Portanto, é necessário realizar estudos que investiguem os possíveis efeitos do Al em ensaios biológicos. A utilização de técnicas *in vitro*, como bioensaios realizados com cultura de células são considerados ferramenta valiosa para a pesquisa e monitoramento de substâncias que comprometem a instabilidade do DNA (Duesberg et al., 1998). Em testes *in vitro* são usadas diferentes linhagens celulares, sendo uma das mais comumente utilizadas às células de ovário de hamster chinês (CHO). A escolha da CHO como objeto de estudo é devido a esta linhagem celular ser amplamente utilizada como células-referência nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade (Santos, 2014).

O teste de citotoxicidade, MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), possibilita a determinação do número de células viáveis após os períodos de tratamento. A genotoxicidade foi baseada na análise de alterações genéticas por meio do teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, no qual permite a visualização de alterações nucleares. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos causados pelo Al em ensaio biológico *in vitro*, a fim de caracterizar aspectos relativos à citotoxicidade e genotoxicidade do metal, visando assim assegurar um padrão de qualidade de águas subterrâneas.

Metodologia

Para o preparo das soluções, foi usado solução padrão estoque monoelementar de 1000 mg L⁻¹ (SpecSolô, SEM-682, EUA), uma contendo a concentração máxima permitida pela portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde (0,2mg/L) e as demais nos valores encontrados nos poços (0,4, 0,6, 0,8, 1,0 e 2,0mg/L). Também foi utilizado soluções de controle positivo de Mitomicina C (2µg/mL) e controle negativo (meio de cultivo). As células CHO (oriundas de ovário de hamster) foram cultivadas em garrafas de poliestireno transparente contendo meio HAM-F10 +DMEM suplementado com 10 % de soro bovino fetal (somente para o teste do micronúcleo), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina. As células foram mantidas em estufa (5% de CO₂ a 37°C) até o momento em que atingiu o estado de semi-confluência para serem sub-cultivadas e preparadas para os experimentos. O período de tratamento das células com o metal foi de 24, 48 e 72 horas.

Para a análise de citotoxicidade, as células foram contadas, ressuspensas e semeadas em uma densidade de 6 x 10³ células/100µL/poço em placas de 96 poços de cultura. Após o período de plaqueamento, o meio de cultura foi removido e substituído por 100µL de meio contendo as diferentes concentrações de Al. Após os períodos de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS, para posterior adição de meio isento de soro contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após incubação a 37°C, o meio foi removido e substituído por 100 µL DMSO para solubilizar os cristais de formazan. A solução de cor (formazano) foi detectada em um comprimento de onda de 630 nm.

Para realização do teste de genotoxicidade foi utilizado o método de análise de micronúcleos com bloqueio da citocinese. As células foram semeadas em placas, sendo utilizada uma placa separada para o CN

e CP. Depois de 24h, as células foram expostas as concentrações do metal e aos controles por 24, 48 e 72h. Ao final de cada tempo adicionou-se a citocalasina B para bloqueio da citocinese. Em seguida, realizou-se a tripsinização das células e a transferência das mesmas para tubos, que posteriormente passaram pelo processo de hipotonização (citrato de sódio (1%)) e centrifugação para o descarte do sobrenadante. As células foram fixadas (metanol: ácido acético) e mantidos sob refrigeração (4°C) em *overnight*. Posteriormente as células foram centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado utilizado para o preparo das lâminas. As lâminas foram coradas com Giemsa 5% para analisar as alterações nucleares como descrito por Fenech (2007). Para cada concentração foram analisadas duas lâminas, contando-se 500 células binucleadas por lâmina.

Para calcular o índice de divisão nuclear (IDN), preparou-se as lamínas e analisou-se duas, contando-se 250 células. Os dados para o cálculo do IDN, foram calculados segundo a equação:

$$IDN = \frac{M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4}{N}$$

Onde M₁-M₄ representam o número de células que possuem de 1 a 4 núcleos e N é o número total de células viáveis.

Os dados do MTT foram analisados através do programa GraphPadPrism 5.0, utilizando One-way análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Dunnett*, para a comparação entre os tratamentos com o controle negativo. Os dados de genotoxicidade e IDN, foram analisados através de Kruskal-Wallis com a *posteriori* de *Dunn* para dados não paramétricos e ANOVA com a *posteriori* de Tukey para dados paramétricos. Os dados foram considerados significantes quando p<0,05.

Resultados e Discussão

Os resultados do teste do MTT, demonstraram que, para o período de 24h a diminuição da viabilidade variou de 21 a 30% entre as concentrações, para o período de 48h essa diminuição foi em cerca de 27 a 28% e para o período de 72h a variação foi de 20 a 26%. Com base nesses resultados, foi possível observar que não há diferença significativa entre os períodos avaliados. Outros estudos com ensaios *in vitro* também evidenciaram a atividade citotóxica do Al. Zhang et al. (2010) observou que o Al em diferentes concentrações induz morte celular por uma combinação de apoptose e necrose. Em 2015, Klingelfuss et al., realizou estudos com Al e considerou o metal como citotóxico, visto que o mesmo danifica as regiões teloméricas levando a instabilidade cromossômica e, como consequência, resulta em morte celular.

Para análise de brotamentos, foi observado que no período de 24h, as concentrações de 0,6, 0,8, 1,0 e 2,0mg/L se diferiram do CN, enquanto que as de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8mg/L se diferiram do CP. A maior concentração (2,0mg/L) apresentou diferença significativa com as demais concentrações. Com o aumento do tempo de exposição, nota-se que todas as concentrações do metal se diferem do CN, enquanto comparado com CP, somente é observado diferença no período de 48h com a concentração de 0,8mg/L. Desta forma, o Al demonstra possuir um poder genotóxico, influenciando na formação de brotamentos nucleares, a partir da concentração de 0,6 mg/L.

Resultados referentes a formação de ponte nuclear durante a exposição ao metal, não apresentaram diferença significativa em nenhum dos períodos. Já para análise de micronúcleos, nos períodos de 24h e 72h, pode-se observar que as concentrações 0,8, 1,0 e 2,0mg/L apresentaram diferença significativa quando comparado ao CN. A concentração de 2mg/L apresentou diferença significativa em todos os períodos quando

comparado ao CN. Portanto, a formação de micronúcleos reforça o resultado de que o Al demonstra potencial genotóxico como evidenciados em estudos realizado por Paz (2017), utilizando linfócitos humanos, onde o mesmo observou-se que o Al em diferentes concentrações apresentou potencial genotóxico, uma vez que se observou a maior frequência de micronúcleos conforme o aumento da concentração do metal. Na literatura, estudos voltados para testes de genotoxicidade envolvendo o Al, ressaltam que quanto maior a concentração do metal, maior é o dano que ele causa no DNA (Pogue et al, 2016; Lima et al., 2007).

Para determinar a medida do potencial proliferativo da fração de células viáveis, utilizou-se o cálculo do IDN. Com base nesse cálculo, somente foi observado diferença significativa entre as concentrações de Al no período de 24h, no qual, as maiores concentrações (1,0 e 2,0mg/L) se diferiram significativamente da menor concentração (0,2mg/L). Para os demais períodos, não foi observado diferença significativa. Os resultados obtidos neste estudo se assemelham com os de estudos da literatura, no qual o Al foi apontado como um metal que pode causar danos no DNA (Klingelfuss et al., 2015; Lima et al., 2007).

Conclusões

O Al possui potencialidade em causar citotoxicidade e induzir danos nas células de CHO *in vitro*. Tais resultados indicam que o valor máximo permitido pela legislação (0,2 mg/L) não causa citotoxicidade à célula, porém, induz a formação de brotamentos nas mesmas, conforme o aumento do tempo de exposição. Para os valores de alumínio encontrados na água de poços de Itaporã em desconformidade com a legislação, foi observado que a partir da concentração de 0,6mg/L houve diminuição da viabilidade celular e que todas as concentrações causam a indução de danos genéticos à célula. Com isso, torna-se necessário realizar ensaios biológicos em células humanas, a fim de investigar efeitos causados pela Al nas mesmas, uma vez que essa água vem sendo consumida sem tratamento.

Referências bibliográficas

- DUESBERG, Peter et al. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13692-13697, 1998.
- GRISOLIA, A. B. Relatório Fundação Nacional da Saúde – FUNASA. **Análise de perigos e pontos críticos de controle dos recursos hídricos para consumo humanos nos municípios de Caarapó e Itaporã, MS, 2015.**
- KLINGELFUS, T. et al. **DNA damage in the kidney tissue cells of the fish *Rhamdia quelen* after trophic contamination with aluminum sulfate.** Genetics and molecular biology, v. 38, n. 4, p. 499-506, 2015.
- LIMA, P. D. L. et al. **Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle.** Food and Chemical Toxicology, v. 45, n. 7, p. 1154-1159, 2007.
- PAZ, Letícia Nazareth Fernandes et al. Evaluation of in vivo and in vitro toxicological and genotoxic potential of aluminum chloride. **Chemosphere**, v. 175, p. 130-137, 2017.
- POGUE, A. I. et al. **Aluminum, the genetic apparatus of the human CNS and Alzheimer's disease (AD).** Morphologie, v. 100, n. 329, p. 56-64, 2016.
- SANTOS, G. S. et al. **Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with 60 Co gamma-radiation.** Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 762, p. 17-23, 2014.
- SILVA, G. et al. Study of the SCC behavior of 7075 aluminum alloy after one-step aging at 163 C. **Journal of materials engineering and performance**, v. 22, n. 1, p. 210-214, 2013.
- VERSTRAETEN, S. V. et al. **Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity.** Archives of toxicology, v. 82, n. 11, p. 789-802, 2008.
- ZHANG, Q. L. et al. **Novel interventions targeting on apoptosis and necrosis induced by aluminum chloride in neuroblastoma cells.** Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents, v. 24, n. 2, p. 137, 2010.