

2.10.05 – Farmacologia e Bioquímica Molecular.

EFEITOS DOS COMPOSTOS ANTRACENO E DELTAMETRINA SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIIS GAMA (PPAR γ) E ADIPOGÊNESE EM CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Mateus Torquato Silva^{1*}, Marcela Martins de Paula Oliveira¹, Sarah Caroline de Souza Silva², Ráiza Yanelli Alves da Silva², Simone Batista Pires Sinoti³, Flora Aparecida Milton⁴, Mariella Guimarães Lacerda⁵, Francisco de Assis Rocha Neves⁶

1. Estudante da Faculdade de Ciências da Saúde, Farmácia, Universidade de Brasília (FS - UnB)
2. Estudante do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília (FS - UnB)
3. Estudante do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (FS - UnB)
4. Professor(a) Adjunto, Departamento de Formação em Ciências Básicas, Universidade Federal Fluminense, Nova Friburgo, RJ, Brasil (UFF – RJ)
5. Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil (FS – UnB)
6. Professor Tiular Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Orientador, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil (FS – UnB)

Resumo

Muitos poluentes ambientais podem interferir na saúde humana e agir como desreguladores endócrinos (DEs). Dentre os DEs, alguns apresentam propriedade adipogênica. Entretanto, pouco se sabe sobre a ação dessas substâncias nos sistemas biológicos, principalmente sobre seu funcionamento nos receptores nucleares. Um exemplo de composto ainda pouco explorado é o antraceno, que é utilizado na fabricação de corantes, inseticidas e conservantes. Outro composto, a deltametrina é um pesticida utilizado no tratamento de doenças parasitárias. Porém, ambos apresentam poucos estudos relacionados à sua atividade adipogênica. O objetivo deste estudo foi investigar **(i)** se o antraceno pode diferenciar células 3T3-L1 a adipócitos, por meio da coloração com óleo vermelho O, **(ii)** o efeito deste composto sobre a atividade transcricional do PPAR γ , em ensaio de transfecção e gene réporter e **(iii)** avaliar a citotoxicidade destes compostos em células Hela, 3T3-L1 e HepG2 por via de ensaio de viabilidade celular.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; poluentes ambientais; receptores nucleares.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Introdução

Nas últimas décadas um aumento expressivo na produção, comercialização e utilização de um grande grupo de substâncias químicas apresenta significância nas atuais mudanças ambientais, onde neste ecossistema habitam diversas espécies [1]. Estes produtos sofrem disseminação ocupando relevante papel na sociedade, e seu uso afeta direta e indiretamente todos os seres vivos, essencialmente os humanos [2]. Atualmente, o estudo desses compostos revela seus impactos aparentes no meio ambiente e provoca efeitos adversos aos que são expostos, mesmo em quantidades extremamente baixas, assim são considerados poluentes ambientais [3].

Os efeitos dos poluentes ambientais sobre a saúde dos seres vivos se torna uma preocupação global [1-5]. Sabe-se que determinadas propriedades são os prováveis fatores acarretadores de prejuízos aos seres vivos, como a toxicidade, lipossolubilidade e bioacumulação [4]. Estudos recentes mostram que alguns destes produtos químicos podem interferir na função endócrina do organismo, atuando como desreguladores endócrinos (DEs) [6-9]. Alguns DEs conhecidos atuam via receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR α , β/δ e γ) [11] e muitos possuem potencial obesogênico que possibilita o desenvolvimento da obesidade. [12]. Entretanto, ainda não se encontra elucidado muitos dos seus efeitos sobre os sistemas biológicos, principalmente ao que diz respeito à ação em receptores nucleares. Exemplos de compostos ainda pouco explorados e aos quais os seres humanos estão expostos são o antraceno e a deltametrina. O antraceno, um hidrocarboneto aromático policíclico, é bastante utilizado na fabricação de corantes, inseticidas e conservantes [10-16], já a deltametrina, um pesticida da classe dos piretroides, amplamente utilizado na agricultura brasileira [17, 18].

Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar **(i)** se o antraceno diferenciará células 3T3-L1 em adipócitos, por coloração com óleo vermelho O, **(ii)** o efeito deste composto sobre a atividade transcricional do receptor ativado por proliferadores peroxissomais do tipo gama (PPAR γ), em ensaios de transfecção e gene

repórter utilizando células HeLa e **(iii)** avaliar a citotoxicidade do antraceno e da deltametrina em células HeLa, 3T3-L1 e HepG2, por meio de ensaio de viabilidade celular.

Metodologia

Ensaio de adipogênese: Células 3T3-L1 foram diferenciadas em adipócitos com insulina (167 nM), dexametasona (1 μ M) e isobutilmetilxantina (0,5 mM) (do dia 0 ao 2), ou somente com insulina (do dia 2 ao 14) e tratadas com DMSO, rosiglitazona (10^{-7} M) ou antraceno (10^{-8} a 10^{-6} M) durante todo o período de diferenciação. No 14º dia, as células foram fixadas, coradas com óleo vermelho O e fotodocumentadas em aumento de 10x. **Transfecção e gene repórter:** Células HeLa foram co-transfectadas com o plasmídeo GAL4-PPAR γ e com o elemento responsivo do GAL4 fusionado ao gene repórter da luciferase, usando o reagente Lipofectamine®2000. Após 6 horas, as células foram tratadas com veículo, rosiglitazona (10^{-5} M) ou antraceno (10^{-7} a 10^{-4} M). A atividade da luciferase foi mensurada em aparelho luminômetro, com a adição do substrato luciferina, depois de 24 horas. **Citotoxicidade:** A citotoxicidade dos compostos foi determinada por meio da avaliação da atividade mitocondrial das células utilizando o método colorimétrico com o MTT (brometo tiazolil azul de tetrazólio).

Resultados e Discussão

Nos ensaios de diferenciação de adipócitos *in vitro*, o antraceno aumentou o acúmulo de lipídeos intracelulares nas concentrações de 10^{-8} até 10^{-6} M (em comparação ao veículo), assim produzindo um efeito adipogênico em cultura de células. Além disso, nos experimentos de transfecção e gene repórter, nas concentrações de 10^{-5} e 10^{-4} M, este composto aumentou em média 1,30 e 1,49 vezes, respectivamente, a atividade transcricional do PPAR γ ($p < 0,05$ em comparação ao veículo), se comportando como um agonista parcial deste receptor nuclear. Nos ensaios de citotoxicidade, as concentrações que resultaram em uma viabilidade celular igual ou superior a 70%, foram consideradas não tóxicas. Nas concentrações testadas (10^{-13} até 10^{-3} M), a deltametrina não apresentou efeito tóxico em células HeLa e, na linhagem 3T3-L1, apenas a concentração de 10^{-4} M foi tóxica para as células. Já em HepG2, dentre as concentrações utilizadas (10^{-14} até 10^{-4} M), nenhuma resultou em viabilidade celular inferior a 70%.

Conclusões

Os nossos resultados mostraram que em ensaios *in vitro*, o antraceno aumentou a atividade transcricional do PPAR γ , se comportando como um agonista parcial deste receptor e promoveu a adipogênese em cultura de células. É provável que este último efeito ocorra via PPAR γ , receptor amplamente expresso no tecido adiposo e considerado o regulador chave da adipogênese. Entretanto, mais ensaios são necessários para confirmar esses achados e também para verificar se os mesmos se reproduzem *in vivo*. Em relação à deltametrina, observou-se baixa toxicidade deste composto nas linhagens celulares testadas, mas ainda não sabemos seu potencial adipogênico e sua ação sobre o PPAR γ . Esperamos que estes resultados possam contribuir, juntamente com outros estudos, na elucidação de como compostos químicos podem afetar a saúde de seres humanos.

Referências bibliográficas

1. Gray LE, Ostby J, Ferrell J, Rehnberg G, Linder R, Cooper R, Goldman J, Slott V, Laskey J. A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Fundam Appl Toxicol* 12:92-108(1989).
2. Guzelian PS. Comparative toxicology of chlordecone (kepone) in humans and experimental animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:89-113(1982).
3. BILA, Daniele Maia and DEZOTTI, Márcia. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quím. Nova* [online]. 2007, vol.30, n.3, pp.651-666. ISSN 0100-4042.
4. Grün F, Blumberg B. Perturberd nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2007;8(2):161-71.
5. Vasseur P, Cossu-Leguille C. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere*. 2006;62(7):1033-42.
6. COLBORN, T. & CLEMENT, C. *Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: the wildlife/human connection*. Princeton: Princeton Scientific Publishing Co, Inc., 1992.
7. COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S. & SOTO, A. M. *Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans*. *Environmental Health Perspectives*, 101: 378-384, 1993.
8. Baker, V.A., 2001. Endocrine disrupters — testing strategies to assess human hazard. *Toxicol. Vitr.* 15, 413–419
9. do Nascimento, M. T. L., et al. (2018). "Determination of water quality, toxicity and estrogenic activity in a nearshore marine environment in Rio de Janeiro, Southeastern Brazil." *Ecotoxicol Environ Saf* **149**: 197-202.

10. EPA – United States Environmental Protection Agency (2007).
11. EURAR, 2007. European Union Risk Assessment Report. Anthracene 120-12-7.
12. dos Santos, Eder da Costa. Biodegradação de antraceno estimulada por ferro. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. 2004.
13. STEFANELLO, Eliezer. **Estudo dos efeitos tóxicos de antraceno sobre a microalga *Chlamydomonas reinhardtii***. 2015. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/T.46.2015.tde-07122015-112524. Acesso em: 2018-07-26.
14. Damato, Murilo; Sobrinho, Pedro Alem; Morita, Dione Mari. Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo na remoção de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e na toxicidade aguda para *Daphnia similis*. In: Asociación Peruana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; AIDIS. Gestión ambiental en el siglo XXI. Lima, APIS, 1998. p.1-17, Tab. Apresentado em: Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 26 (AIDIS 98), Lima, 1-5 nov. 1998.
15. CARVALHO, MARIA VILMÁRIA FONTES. Avaliação química e toxicológica de solo contaminado por HPAs submetido à biodegradação pelo fungo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA. 2010
16. LADOU, Joseph; HARRISON, Robert J. CURRENT Medicina Ocupacional e Ambiental. 5.ed. Porto Alegre: AMGH, 2016
21. Oliveira, M.R., et al. Avaliação dos Efeitos do Pesticida Deltametrina no Metabolismo Energético e em alguns Parâmetros Reprodutivos de *Hyalella castroi*. Laboratório de Fisiologia da Conservação - Programa de Pós-graduação em Zoologia – PUCRS. 2006.
22. SANTOS, Mônica Alessandra Teixeira dos, AREAS, Miguel Arcanjo, REYES ,Felix Guillermo Reyes. PIRETRÓIDES – UMA VISÃO GERAL v.18, n.3, p. 339-349, jul./set. 2007