



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO MUTAGÊNICO DO METILMERCÚRIO *IN VITRO*: ANÁLISE  
POR MEIO DO TESTE DO MICRONÚCLEO E ENSAIO COMETA.

LUDMILLA SOUZA CAMPOS DA SILVA

Belém  
2017



LUDMILLA SOUZA CAMPOS DA SILVA

EFEITO MUTAGÊNICO DO METILMERCÚRIO *IN VITRO*: ANÁLISE  
POR MEIO DO TESTE DO MICRONÚCLEO E ENSAIO COMETA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Colegiado do Curso de Licenciatura em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
do Pará, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Licenciado em Biologia.  
Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano  
Corrêa de Oliveira.

Belém  
2017

LUDMILLA SOUZA CAMPOS DA SILVA

EFEITO MUTAGÊNICO DO METILMERCÚRIO *IN VITRO*: ANÁLISE  
POR MEIO DO TESTE DO MUCRONÚCLEO E ENSAIO COMETA.

---

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira  
ICEN/UFPA  
Orientador

Banca Examinadora:

---

Dra<sup>a</sup> Lygia Sega Nogueira  
PPGO/UFPA

---

Ms<sup>a</sup> Bruna Puty Silva Gomes  
PPGNBC/UFPA

Belém  
2017

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>I.1 Mercúrio</b> .....	2
<b>I.2 Testes de Genotoxicidade e Citotoxicidade</b> .....	3
<b>I.2.1 Teste do Micronúcleo</b> .....	4
<b>I.2.2 Ensaio Cometa</b> .....	5
<b>I.3 Justificativa</b> .....	6
<b>I.4 Objetivo</b> .....	7
<b>I.4.1 Objetivo Geral</b> .....	7
<b>I.4.2 Objetivos Específicos</b> .....	7
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	8
<b>II.1 Cultivo Celular</b> .....	8
<b>II.2 Tratamento das Culturas</b> .....	8
<b>II.2.1 Exposição ao mercúrio</b> .....	8
<b>II.2.2 Controle</b> .....	8
<b>II.3 Teste de Viabilidade por MTT</b> .....	9
<b>II.4 Teste do Micronúcleo</b> .....	9
<b>II.5 Ensaio Cometa</b> .....	10
<b>III. RESULTADOS</b> .....	11
<b>III.1 Teste de Viabilidade por MTT</b> .....	12
<b>III.2 Teste do Micronúcleo</b> .....	12
<b>III.3 Ensaio Cometa</b> .....	13
<b>IV. DISCUSSÃO</b> .....	16
<b>V. CONCLUSÕES</b> .....	18
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	19

## LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo do mercúrio e a rota de contaminação por ingestão.....	3
<b>Figura 2.</b> Alterações avaliadas pelo teste do micronúcleo.....	5
<b>Figura 3.</b> Imagem representativa do ensaio cometa em uma linhagem celular.....	6
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografia demonstrando as alterações observadas pelo teste do micronúcleo.....	12
<b>Figura 5.</b> Nucleóides encontrados nos tratamentos.....	13
<b>Gráfico 1.</b> Viabilidade celular após a exposição ao metil mercúrio.....	11
<b>Gráfico 2.</b> Porcentagem de DNA íntegro nos tratamentos.....	14
<b>Gráfico 3.</b> Porcentagem de DNA danificado nos tratamentos.....	14
<b>Tabela 1.</b> Dados brutos obtidos pelo teste do micronúcleo.....	12
<b>Tabela 2.</b> Frequência de alterações encontradas nos tratamentos.....	13
<b>Tabela 3.</b> Média dos tratamentos.....	14

## I. INTRODUÇÃO

Inúmeros compostos químicos, resultantes do crescimento industrial vem sendo despejados no meio ambiente, ao longo de anos. Estes compostos chegam até o ambiente aquático, na maioria das vezes sem nenhum tratamento prévio e acabam por poluir o meio ambiente e se inserir em cadeias alimentares (Wu *et al*, 2016). Dentre eles, os metais pesados se caracterizam por serem persistentes, estarem em diversas formas químicas e em vários compartimentos biológicos como solo, água contaminada, em partículas de ar e em centros urbanos (Castellanos & Fuente 2016), e possuem um potencial citotóxico conhecido, sendo atualmente um problema ambiental e de saúde pública (Zhua *et al*, 2014). Os metais pesados também fazem parte dos componentes ativos de muitos agrotóxicos, sendo que o uso de sais de zinco, arseniatos de cobre e de chumbo e compostos metalo-orgânicos têm elevado os níveis de contaminação do solo com esses elementos. Portanto, o acúmulo dos metais pesados também é causado pelo uso repetido e excessivo de fertilizantes, pesticidas e resíduos orgânicos, nesse caso não somente em corpos aquáticos (pela ação de chuva), mas também no solo (Barbosa *et al*, 2010).

O material genético dos seres vivos está sujeito a diversas alterações ao longo de sua existência, devido a ação de agentes físicos, químicos e biológicos. Ao ocorrer uma modificação estrutural ou química no DNA, esta é denominada de mutação (Düsman *et al*, 2012). Considerando o potencial mutagênico de várias substâncias poluentes, dentre estas os metais pesados, o surgimento de uma nova área de pesquisa se fez necessário, a toxicogenética, na qual a interação do genoma com agentes químicos é avaliada (Abilev & Glazer, 2013).

## I.1 Mercúrio

O mercúrio é um metal de transição, possui o número atômico 80 e massa atômica 200,6. Possui um baixo ponto de fusão  $-38,9^{\circ}\text{C}$ , o que permite seu estado líquido em temperatura ambiente (Berlin *et al*, 2015).

O mercúrio é utilizado pela humanidade há cerca de 3000 anos, atualmente ainda é usado na fabricação de termômetros, barômetros, amálgama dentaria e em cosméticos branqueadores (Ye *et al*, 2016), pode ser encontrado em várias formas: elementar, metálica, inorgânica e em compostos orgânicos, em sua maioria em formas associadas a outros elementos. Todas as suas formas podem ser encontradas no meio ambiente, e causam inúmeros efeitos tóxicos. O efeito varia conforme a forma do mercúrio e o tempo de exposição (Pirrone *et al*, 2010).

Esse metal pode ser naturalmente encontrado no ar, solo e em meios aquáticos, a partir de atividades vulcânicas e pelo intemperismo de rochas. Em ambientes aquáticos, o metil mercúrio (MeHg) é o composto orgânico mais tóxico, sendo naturalmente encontrado como produto do metabolismo, resultado da metilação do mercúrio inorgânico realizado por organismos anaeróbicos em metil mercúrio orgânico (Berlin *et al*, 2015; Kim *et al*, 2015).

Uma característica importante a se destacar do mercúrio é sua capacidade de biomagnificar e bioacumular nos organismos, em especial nos predadores de topo de cadeia. Todavia, traços de mercúrio, em sua maioria na forma de metil mercúrio, podem ser encontrados em quase todos os peixes (Amaro *et al*, 2014, Burger & Gochfeld, 2011). O homem acaba se contaminando com mercúrio preferencialmente pela ingestão de peixes contendo mercúrio (Figura 1), porém a exposição ao mercúrio também se dá pela inalação de vapores e através do contato tóxico com a pele. O mercúrio ainda continua sendo utilizado em cosméticos clareadores, em sabonetes e batons (Ho *et al*, 2017). A medicina tradicional chinesa utilizou por séculos metais pesados, como mercúrio e arsênio na composição de seus medicamentos herbais (Wu *et al*, 2013).



Figura 1. Ciclo do mercúrio e a rota de contaminação por ingestão, adaptado de IISD 2017.

A conscientização dos impactos causados pela exposição ao mercúrio ganhou importância em meados de 1950, após um acidente envolvendo uma indústria química japonesa, na costa do Japão, que ficou conhecida como a doença de Minamata, síndrome caracterizada por danos neurológicos, causando distúrbios motores e sensoriais as mãos e nos pés, danos oculares e auditivos e até a morte (Ha *et al*, 2016). Na Amazônia, em meados de 1970, a extração de ouro resultou em uma expansão garimpeira, trazendo como consequências o despejo de mercúrio no meio ambiente. Para a amalgamação do ouro, estima-se que na década de 80 a 90, cerca de 2.500 toneladas de mercúrio foram lançadas nos rios da Amazônia Legal (Siqueira *et al*, 2012, Santos 2002).

## I.2 Testes de Genotoxicidade e Citotoxicidade

A genética toxicológica surgiu a partir de uma necessidade de avaliar o potencial carcinogênico de agentes químicos em humanos, entretanto pela dificuldade em se realizar testes *in vivo*, os testes *in vitro* foram ganhando destaque por se tornarem mais aplicáveis em relação aos testes *in vivo*, pelo custo menor de manutenção, pela possibilidade da repetição das técnicas e pela substituição de um modelo vivo por células sanguíneas ou cultura celular (Ellis *et al*, 2013). O teste do micronúcleo e o ensaio cometa são atualmente testes utilizados na detecção da citotoxicidade e genotoxicidade.



### I.2.1 Teste do micronúcleo

O protocolo atual do teste do micronúcleo foi desenvolvido por Fenech e Morley em 1985. Este teste foi estabelecido para a detecção de danos cromossômicos numéricos e estruturais, permitindo a avaliação da aneuploidicidade e clastogenicidade de uma determinada substância. A presença de micronúcleos possibilita a detecção do potencial genotóxico de um agente mutagênico, visualizados como um atraso na separação dos cromossomos durante a metáfase, resultando na perda de um cromossomo inteiro, ou em uma quebra de um segmento cromossômico. Este atraso resulta em uma aneuploidia (perda de um cromossomo inteiro) ou em um efeito clastogênico (perda de um segmento) (Torres-Bugarín *et al*, 2015; Kimura *et al*, 2013, Rosales-Rimache *et al*, 2013). O teste do micronúcleo também é utilizado como uma ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental (Soto-Ri *et al*, 2010).

O protocolo do teste do micronúcleo *in vitro* que utiliza a citocalasina B (CtB) foi uma modificação realizada por Fenech, que inibe a polimerização do filamento de actina, impedindo a clivagem da célula mãe em duas células filhas (citocinese), porém não inibe a divisão celular, resultando em uma célula contendo dois núcleos

Os parâmetros utilizados na avaliação do efeito genotóxico e citotóxico demonstram os possíveis danos resultantes, por meio da presença de células contendo micronúcleo, indicando uma perda cromossômica, uma quebra cromossômica ou uma amplificação cromossômica. Além disso, a presença de pontes intranucleares pode ser resultado de uma migração de cromátides para polos opostos na célula durante a divisão celular, enquanto a presença de brotos pode indicar uma amplificação que está em processo de eliminação do núcleo. Adicionalmente, a observação de necroses e apoptoses indica danos que inviabilizam a célula, resultando na morte celular imediata e a morte celular programada (Figura 2) (Fenech, 2006).

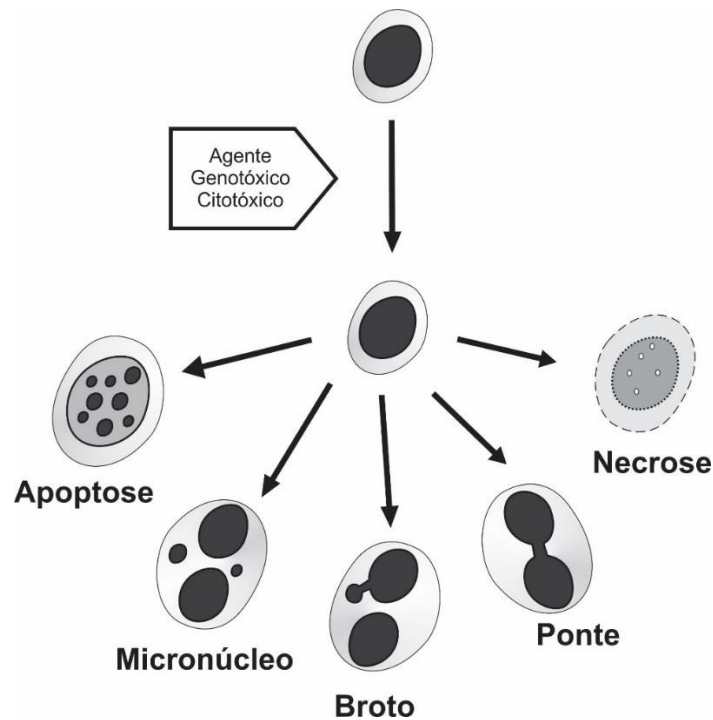


Figura 2. Alterações avaliadas pelo teste do micronúcleo.

### 1.2.2 Ensaio cometa

O ensaio de eletroforese em gel de célula única, também conhecido como ensaio cometa, foi desenvolvido por Ostling e Johanson (Kimura *et al*, 2013). É um teste simples, rápido e sensível para a detecção de danos ao DNA, se destacando dos demais testes utilizados na avaliação genotóxica por necessitar um baixo número de células, possuir um baixo custo e conseguir detectar quebras pequenas no DNA (Glei *et al*, 2016).

Durante o processo, a célula é embebida em agarose de baixo ponto de fusão, é lisada em uma solução rica em sais, onde todas as estruturas celulares são degradadas, restando somente o DNA e sua matriz nuclear, passando esta célula a ser chamada de nucleóide, que é submetida à uma corrente elétrica de baixa voltagem. Como resultado, o DNA danificado irá migrar para o ânodo da cuba, o rastro formado resulta em uma estrutura semelhante a um cometa (di Paolo 2006).

Várias versões deste ensaio foram desenvolvidas, com o objetivo de avaliar diferentes tipos de danos ao material genético, entretanto a versão mais

utilizada é a versão alcalina (pH > 13), que se mostrou mais efetiva na avaliação de danos causados por agentes genotóxicos, pois possibilita a identificação de quebras primárias ao DNA (Bruschweiler *et al*, 2016, Pu *et al*, 2015).

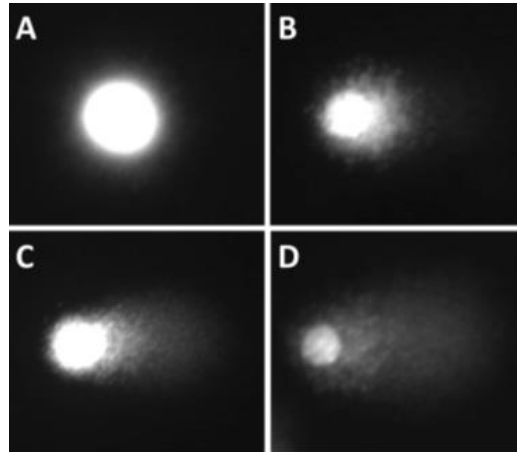


Figura 3. Imagem representativa do ensaio cometa em uma linhagem celular, onde em A o dano é mínimo e em B, C e D ocorre uma progressão no tamanho da cauda, retirado de Gleis 2016.

### I.3 JUSTIFICATIVA

O progresso e o desenvolvimento industrial trouxeram, como consequência inevitável, a mudança do ambiente químico e exposição do ser humano a um número crescente e variável de agentes químicos. A crescente exposição a metais pesados, pode, em um curto prazo, contribuir à etiologia de várias doenças como câncer, diabetes, e doenças cardiovasculares. Portanto, a quantificação de eventos mutagênicos induzidos por estes metais pesados, tornaram-se de vital importância. A utilização de cultura de células em teste *in vitro* possibilita uma ampla aplicabilidade de estudos a nível celular e genômico, pois são rápidos, sensíveis e com ótimo custo benefício em relação aos estudos *in vivo* (Rogerio *et al*, 2012). Os metais pesados podem causar uma variedade de efeitos tóxicos conhecidos. O teste do micronúcleo *in vivo* e *in vitro*, juntamente com o ensaio cometa são exemplos de testes recomendados por diferentes órgãos controladores, como por exemplo, a ANVISA. Além disso, devido a sua versatilidade, esses dois testes também têm sido amplamente utilizados em toxicogenômica, nutrigenômica, danos e reparo no DNA, biomonitoramento humano e ambiental, pesquisa e potencial uso no tratamento do

câncer, síndromes genéticas, estudos clínicos, fertilidade humana e animal, etc (ANVISA, 2016). A literatura relata trabalhos onde a dose escolhida se refere a LC<sub>50</sub> da cultura celular escolhida, na sua maioria culturas neurais ou linhagens comerciais. Poucos trabalhos descrevem os efeitos relacionados a doses não letais em linfócitos e linhagens neurais. Portanto não se tem registro dos efeitos resultantes de uma exposição a uma dose subletal em um período menor que 2 horas e em culturas primárias de células epiteliais (Maués *et al*, 2015).

## **I.4 OBJETIVOS**

### **I.4.1 Objetivo geral**

Analisar as propriedades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do Metil mercúrio in vitro, em uma linhagem de fibroblastos humanos.

### **I.4.2 Objetivos específicos**

- Investigar a ocorrência de danos celulares permanentes após a exposição ao metil mercúrio, que resultem em quebras cromossômicas e formação de micronúcleos;
- Investigar a ocorrência de danos imediatos ao DNA após a exposição ao metil mercúrio na forma de quebras e formação de cometas;
- Investigar a citotoxicidade após a exposição ao metil mercúrio, pelo teste de MTT.

## **II. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **II.1 Cultivo Celular**

A linhagem de células AN-27 é oriunda de células derivadas de tecido epitelial de prepúcio humano, que se encontra no Banco de Células do Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto Evandro Chagas. Estas células foram cultivadas a partir da passagem #10, em garrafas de cultura celular de 25 cm<sup>3</sup>, utilizando meio F-10 (GIBCO), suplementado com 20% de soro bovino fetal (GIBCO). As culturas foram mantidas a 37°C, em atmosfera constituída de 95% de ar ambiental e 5% de CO<sup>2</sup>, trocando-se o meio de dois em dois dias. Com aproximadamente uma semana, as células presentes na garrafa foram retiradas utilizando-se Tripsina–EDTA (0,025%) (SIGMA), e divididas em novas garrafas a fim de se obter o número necessário para execução dos experimentos.

### **II.2 Tratamento das Culturas**

#### **II.2.1 Exposição ao Mercúrio**

Após o crescimento, foram realizadas as exposições das culturas celulares ao mercúrio por um período de 30 minutos. Depois da exposição, estas foram lavadas com tampão HANK'S (GIBCO) e as células utilizadas no teste de micronúcleo foram mantidas em Citocalasina B (8µg/ml) (GIBCO) por 30 horas para induzir a formação de células binucleadas. Já as células destinadas para o ensaio cometa, foram colhidas com a ação da tripsina.

Utilizou-se uma solução de 5 µM de Metil Mercúrio [CH<sub>3</sub>Hg]<sup>+</sup> em meio F-10, pH ajustado para 7.4, segundo metodologia de Amoli (2011).

O controle foi tratado com o meio F-10, sem adição de nenhuma substância genotóxica.

### II.3 Teste de Viabilidade celular por MTT

Para a identificação da toxicidade do metil mercúrio, as culturas foram plaqueadas em uma placa de 24 poços e expostas a diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{M}$ ) de metil mercúrio por 30 minutos e em seguida foram lavadas com HANK'S e na sequência a placa foi incubada por 2 horas com o MTT ( 4,5 dimethylthiazol-3,5-diphenyltetrazolium, 0.5 mg/ml, LIFE TECHNOLOGIES), à 37°C e revelada com DMSO (( $\text{CH}_3$ ) $_2$ SO, DINÂMICA), a absorbância dos poços foi medida em um comprimento de onda de 560 nm, a viabilidade foi mensurada a partir da porcentagem da média dos poços de cada concentração e comparados com o grupo controle.

### II.4 Teste do Micronúcleo

Para a colheita das células, o conteúdo das garrafas (meio + soro) foi transferido para tubos de centrifuga e reservado. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de HANK'S e soltas da parede da garrafa, utilizando-se 800  $\mu\text{l}$  de Tripsina–EDTA (0,025%). O conteúdo das garrafas foi reservado e as células em suspensão foram homogeneizadas e transferidos para tubos de centrifuga. A suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante resultante descartado, reservando-se apenas o *pellet*, e posteriormente foram adicionados 3,5 mL de KCl (0,075M), e após 30 segundos, foram adicionados 3 ml de fixador Carnoy (3 metanol:1 ácido acético). O material foi homogeneizado e novamente centrifugado por 10 minutos a 1000 RPM para lavagem. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a última lavagem o sobrenadante foi novamente desprezado, deixando-se cerca de 2 ml para suspensão do *pellet* e preparo das lâminas.

Foram preparadas doze lâminas para cada tratamento, e contabilizadas 500 células por lâmina, totalizando 6.000 células por tratamento. A análise seguiu os critérios utilizados por Salvadori (2003), em que são selecionadas células binucleadas com delimitações nucleares e citoplasmáticas intactas e não sobrepostas, além de considerar o tamanho, o padrão e a intensidade de coloração dos núcleos. O MN presente deve ter padrão de coloração semelhante ao do núcleo principal, não

apresentar refringência e ter um tamanho entre 1/16 a 1/3 do núcleo da célula. A análise dos resultados foi realizada pelo teste estatístico Teste T ( $p < 0,05$ ).

## II.5 Ensaio Cometa

A montagem das lâminas foi realizada seguindo-se o protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações. As lâminas foram cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%) (SIGMA). Foi adicionada uma mistura de 20  $\mu$ l de suspensão celular e 120  $\mu$ l de agarose *low melting* (0,75%) (SIGMA), posteriormente cobertas com lamínula e levadas para a geladeira (4°C) por 20 minutos. Em seguida, foram armazenadas em uma cuba escura contendo solução de lise (1% Triton X-100, 10% DMSO, 2.5MNaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 10), por no mínimo, 12 horas. Após a lise, foram dispostas em uma cuba para eletroforese com uma solução gelada e recém-preparada de eletroforese (300 mMNaOH, 1 mM EDTA, pH 13) ficando em repouso por 20 minutos, para desnaturação do DNA. Uma corrente elétrica de 300 mA e 20V foi aplicada à cuba por mais 20 minutos, e após a corrida, as lâminas foram neutralizadas com 5mL de solução tampão neutralizadora com pH 7,5 de Tris 0,4 M (SIGMA), em três séries de 5 minutos cada. Em seguida, foram lavadas com água destilada, postas para secar e fixadas com álcool etílico absoluto (MERCK) por 10 minutos. As lâminas foram coradas com DAPI e *antifade* (LIFE TECHNOLOGIES). Foram analisados 300 nucleóides por tratamento, por microscopia de fluorescência em aumento de 400 vezes, classificados com o auxílio do Programa Komet 6.0, (Sistema Andor-Citogem), considerando os parâmetros porcentagem de DNA fragmentado presente no rastro (cauda) e o percentual de DNA íntegro no nucleóide (cabeça). Os resultados foram analisados por meio do teste estatístico Teste T ( $p < 0,05$ ).

### III. RESULTADOS

#### III.1 Teste de Viabilidade celular por MTT

As células expostas as concentrações crescentes de metil mercúrio (1, 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{M}$ ) mostraram uma redução na viabilidade celular, a partir da letalidade por efeito, em relação ao controle (Figura 4), a concentração escolhida de 5  $\mu\text{M}$  foi baseada neste resultado, onde esta concentração de efeito se refere à  $\text{LC}_{95}$ .

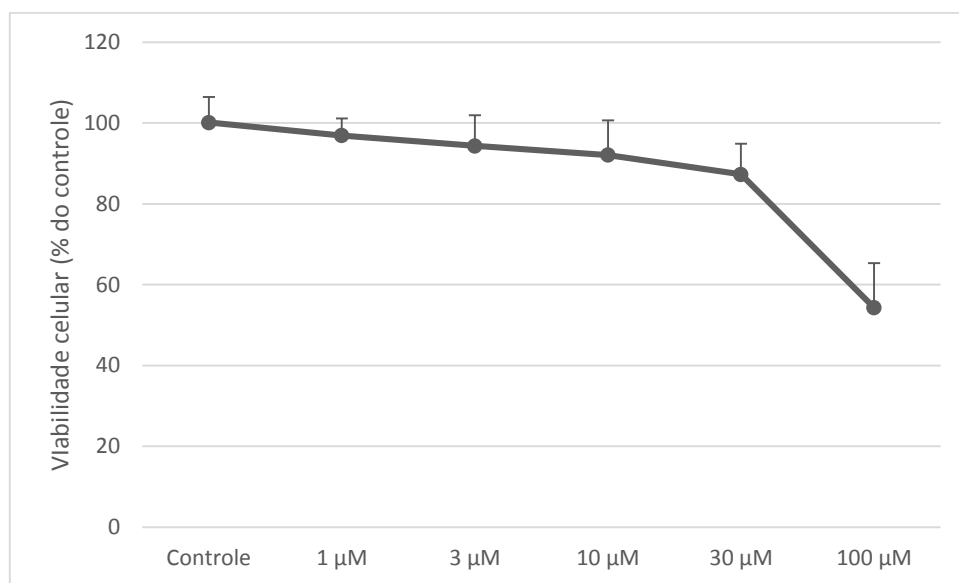


Figura 4. Viabilidade celular após a exposição ao metil mercúrio.

#### III.2 Teste do Micronúcleo

Diversas alterações foram encontradas relacionadas com danos no material genético, como a presença de micronúcleos, apoptoses, pontes e brotos, imagens representativas das alterações encontradas nos diferentes tratamentos são demonstradas na figura 5.

A tabela 1 mostra as frequências de todas as alterações encontradas, o número de células em apoptose foi estatisticamente significativo em relação ao grupo não tratado ( $F=239,6$  e  $p<0,01$ ). Não foram encontradas células em necrose em ambos os grupos, assim não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $F= -11$  e  $p=1$ ).



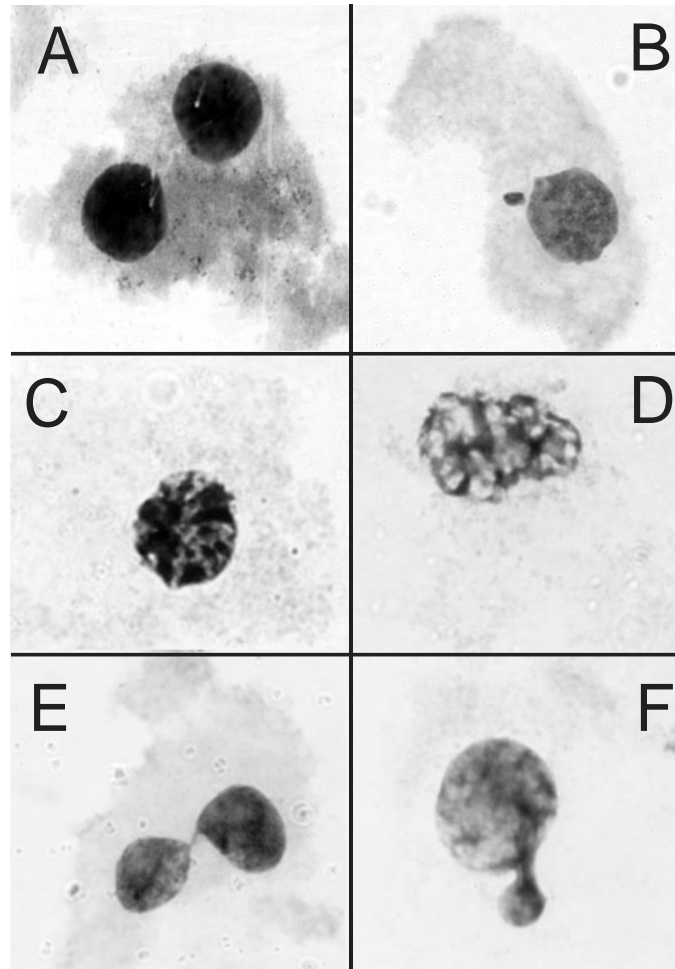


Figura 5. Fotomicrografia demonstrando as alterações observadas pelo teste do micronúcleo. (A) Célula binucleada, (B) Célula com um micronúcleo, (C) Célula em apoptose, (D) Célula em necrose, (E) Célula com ponte e (F) Célula com broto, aumento de 1000x.

Tabela 1. Frequência de alterações encontradas nos tratamentos, \*p <0,05.

	<b>Apoptose</b>	<b>Necrose</b>	<b>Micronúcleo</b>	<b>Ponte</b>	<b>Broto</b>
<b>Controle</b>	53	0	212	246	263
<b>Metil mercúrio</b>	150*	0	1215*	675*	688*

O número de células que apresentaram micronúcleos foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ( $F= 241,7$  e  $p<0,05$ ). As células que apresentaram pontes intranucleares foram mais frequentes no tratamento de metil mercúrio do que no controle ( $66,5$  e  $p<0,01$ ). A frequência de células com broto também foram mais frequentes não grupo tratado com metil mercúrio ( $F= 37,7$  e  $p<0,01$ ).

### III.3 Ensaio Cometa

Foram detectadas quebras no DNA, evidenciadas pela formação de caudas no tratamento de metil mercúrio, abaixo segue uma imagem representativa de nucleóides encontrados de em tratamento (Figura 5)

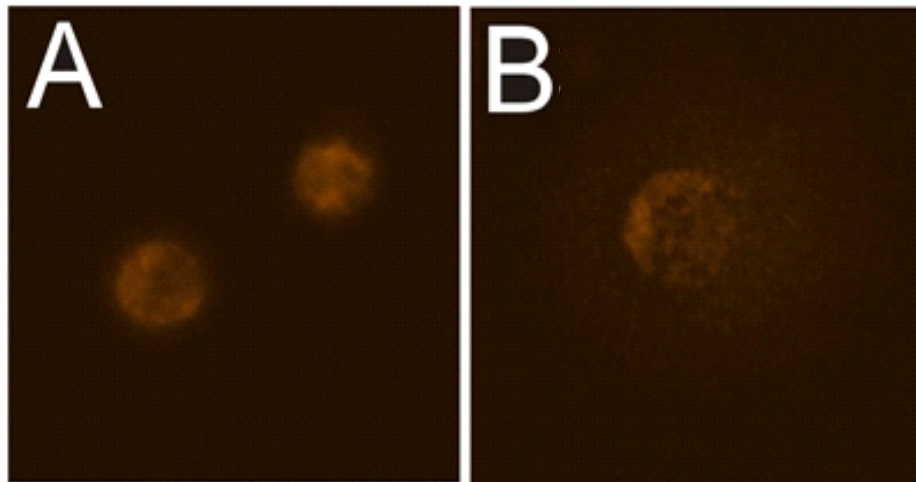


Figura 6. Nucleóides encontrados nos grupos. (A) Controle, (B) Metil Mercúrio, aumento de 400x.

A figura 7 mostra os dados percentuais relacionados ao DNA íntegro na cabeça dos nucleóides, que corresponde a quantidade de DNA não lesada, observando-se a seguinte relação de acordo com o DNA íntegro.

**Controle > Metil mercúrio**

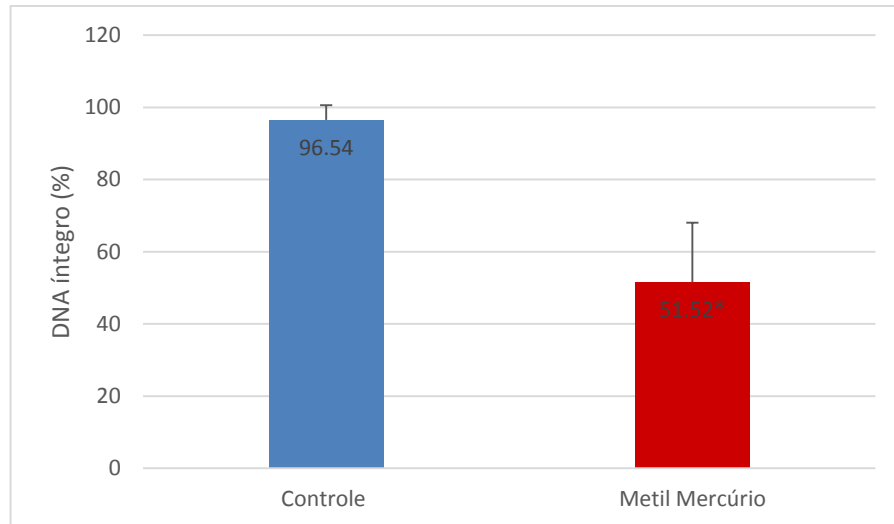


Figura 7. Porcentagem de DNA íntegro nos tratamentos, \* $p < 0,05$ , Grau de liberdade= 335, desvio padrão de 4,5 para o controle e 16,8 para MeHg

A figura 8 mostra os dados percentuais relacionados ao DNA danificado dos nucleóides, originada pelas quebras no DNA, observando-se a seguinte relação:

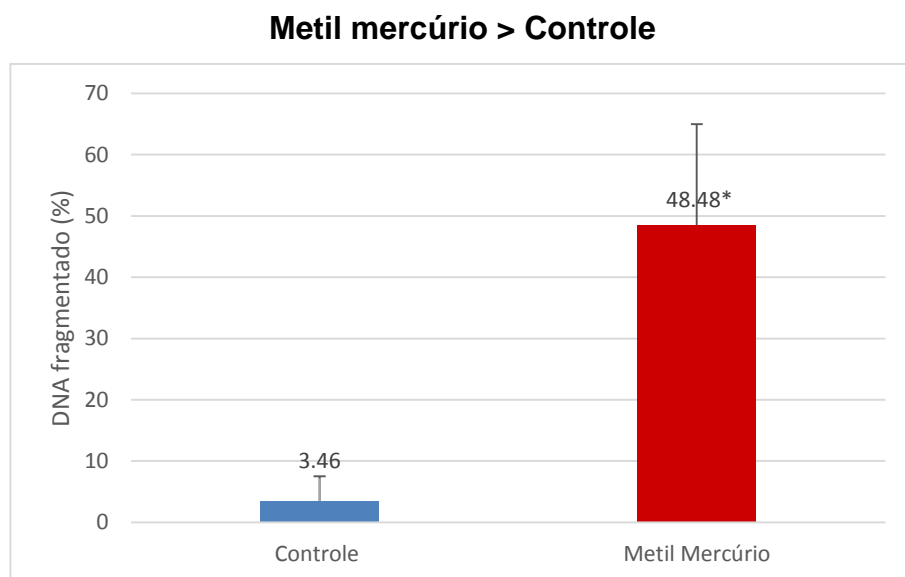


Gráfico 3. Porcentagem de DNA danificado nos tratamentos, \* $p < 0,05$ , Grau de liberdade= 335, desvio padrão de 4,5 para o controle e 16,8 para MeHg.

#### IV. DISCUSSÃO

O mercúrio é um poluente global que afeta ecossistemas e ao homem, a exposição ao metil mercúrio resulta em efeitos devastadores já descritos na literatura, onde o mais conhecido foi o desastre de Minamata (Ha *et al*, 2016). Avaliar os efeitos relacionados com a exposição ao metil mercúrio contribuem na compreensão dos mecanismos de toxicidade e podem auxiliar no desenvolvimento de mais pesquisas em monitoramentos ambientais. O potencial genotóxico do metil mercúrio foi avaliado por meio de duas técnicas de avaliação citotóxica e genotóxica, importantes ferramentas utilizadas na definição de efeitos mutagênicos.

A utilização de uma cultura celular primária de fibroblastos se mostrou viável em comparação a linhagens comerciais, pois é um tecido de origem humana de fácil obtenção e pode ser utilizada como um referencial normal não comercial.

A importância de se avaliar efeitos em uma dose sub letal é referente aos seguintes questionamentos; se com uma alta taxa de células vivas, será que estas células viáveis não sofreram alguma alteração diferente de morte celular? Quais seriam estes danos? Tais danos são permanentes ou podem ser corrigidos?

A partir dos dados obtidos pelo teste do micronúcleo o tratamento com o metil mercúrio parece causar um retardo no ciclo celular e conseqüentemente, aumento no número de anormalidades celulares como pontes e brotos. Ao verificar o número de células com micronúcleos, os altos valores podem ser justificados pela maior frequência de aneuploidias nas células (Sales & Guimarães, 2012). O metil mercúrio possui a capacidade teratogênica e um dos mecanismos afetados seria a via de pentose fosfato, responsável pela regulação da ribose para a síntese do DNA, uma modificação nessa via poderia resultar em células com micronúcleos, brotos e ponte. O trabalho de Amoli *et al* (2011) demonstra a modificação nesta via resultante da exposição ao metil mercúrio em uma cultura de fibroblastos de feto humano, onde a cultura sofre uma redução na proliferação celular em concentrações crescentes de metil mercúrio (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ). Ao comparar os efeitos resultantes da exposição em ambos trabalhos, fica evidente que mesmo em uma baixa dose e em uma exposição de curto prazo, os efeitos citotóxicos são semelhantes ao de uma exposição por

período maior. O trabalho de Zimmermann *et al* (2016) utiliza um curto período de exposição, semelhante a este trabalho, onde a justificativa seria baseada na cinética e entrada dos compostos mercuriais.

Com uma modificação no ciclo celular, o grupo sulfidrila das tubulinas celulares não funciona corretamente, o que pode justificar a presença de pontes e brotos no tratamento, resultado de uma modificação no ciclo celular. Em um trabalho realizado por Nersesyán *et al* (2016), foi demonstrado que em uma baixa concentração de metil mercúrio semelhante a utilizada neste trabalho, a frequência de micronúcleos foi significativa em linfócitos humanos. Isso aconteceria porque o metil mercúrio interage com o DNA, resultando em modificações na estrutura do DNA, e conseqüentemente causam quebras na molécula de DNA, produzindo os micronúcleos (Berlin *et al*, 2015).

A taxa de células em apoptose encontradas no tratamento na exposição ao metil mercúrio pode ser justificada pelo aumento da caspase-3, importante proteína ligada a morte celular programada. O trabalho de Watanabe *et al* (2013) mostrou que em uma exposição de 3 a 12 horas em C6 com uma concentração de 1  $\mu\text{M}$  de metil mercúrio resultou em um aumento na atividade da caspase-3 e uma redução em uma proteína do grupo de proteínas anti-apoptótica.

O trabalho de Petroni *et al* (2011) mostrou que concentrações baixas (50 e 100 nM) de metil mercúrio em uma linhagem de neuroblastoma (SH-SY5Y) expostas por 24 e 48 horas, estas concentrações causaram estresse oxidativo, mostrando um efeito genotóxico celular, com um aumento das espécies reativas de oxigênio e uma indução de quebras ao DNA (Crespo-Lopez *et al*, 2009). O trabalho de Ynalvez (2016) relata o potencial tóxico do mercúrio, onde este atua como um potente indutor de estresse oxidativo, resultante de interações que resultam na inativação de enzimas importantes na redução de espécies reativas de oxigênio. O metil mercúrio induz a atividade do óxido nítrico, que resulta na oxidação de biomoléculas (Costa-Malaquias 2014). Assim, é possível que a alta porcentagem de DNA danificado observado nas células tratadas com metil mercúrio seja decorrente destes mecanismos de ação. Tal característica do metil mercúrio pode justificar o aumento no tamanho da cauda encontrado nos nucléolos em relação ao grupo não tratado.

Os resultados relacionados com o teste do micronúcleo após a exposição ao metil mercúrio são permanentes, tais resultados revelam que apesar da dose utilizada induzir uma leve redução na viabilidade celular o metal interage com o genoma de forma semelhante a concentrações maiores e resulta em modificações que podem ser desde uma perda de um braço cromossômico ou um cromossomo inteiro a uma amplificação. As quebras visualizadas pelo ensaio do cometa são passíveis de correção pelo sistema de reparo celular. As mudanças na fisiologia celular pós exposição da linhagem celular utilizada permanecem incertos, a utilização de outros testes se torna imprescindível.

## **V. CONCLUSÕES**

A exposição ao metil mercúrio em uma dose sub letal por um curto período de exposição em uma linhagem primária de fibroblastos se mostrou semelhante aos resultados a uma exposição por períodos maiores e em outras linhagens celulares, os resultados dos testes aplicados corroboram com os demais trabalhos. A aplicação de testes que avaliam o potencial citotóxico e genotóxico se mostram confiáveis na determinam deste potencial em metais pesados, todavia se faz necessária a utilização de uma gama maior de ferramentas de estudos mutagênicos, afim de cada vez mais elucidar o perfil tóxicos destes metais pesados.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILEV, S. K. & GLASER, V. M. Genetic Toxicology: Findings and Challenges. **Russian Journal of Genetics**, 49: 70-80. 2013.

AMARO, C. S. O.; JUNIOR, D. R.; DA SILVA, M. C. F.; LIMA, A. A. S.; SANTOS, G. F. S.; PINHEIRO, M. C. N. Concentração de mercúrio total (Hg-T) em peixes comercializados em diferentes períodos sazonais no Mercado do Ver-o-Peso, Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 5. 2014.

AMOLI, J. S.; BARIN, A.; EBRAHIMI-RADC, M.; SADIGHARAA, P. Cell damage through pentose phosphate pathway in fetus fibroblast cells exposed to methyl Mercury. **Jornal of Applied Toxicology**, 31: 685–689. 2011.

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73: 320-325. 2010.

BERLIN, M.; ZALUPS, R. K.; FOWLER, B. A. **Mercury In: Handbook on the Toxicology of Metals**. Elsevier, 2: 1013-1075.2015.

BRASIL. ANVISA. **Relatório de Atividades GGTOX-2016**.

BRUSCHWEILER, E. D.; WILD, P.; HUYNH, C. K.; SAVOVA-BIANCHI, D.; DANUSER, B.; HOPF, N. B. DNA damage among Wood Workers Assessed with the Comet Assay. **Environmental Health Insights**,10: 105–112. 2016.

BURGER, J. & GOCHFELD, M. Mercury and Selenium Levels in 19 Species of Saltwater Fish from New Jersey as a Function of Species, Size, and Season. **Science of the Total Environment** :1418–1429. 2011.

BUSS, D.F.; BATISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L. Bases conceituais para aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade de água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, 19(4): 465-473. 2003.

CASTELLANOS, M. J & FUENTE, A. The Adverse Effects of Heavy Metals with and without Noise Exposure on the Human Peripheral and Central Auditory System: A Literature Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health** , **13** :1223. 2016.

COSTA-MALAQUIAS, A.; ALMEIDA, M. B.; MONTEIRO, J. R. S.; MACCHI, B. M.; DO NASCIMENTO, J. L.; CRESPO-LOPEZ, M. E. Morphine protects against methylmercury intoxication: a role for opioid receptors in oxidative stress? **PLOS ONE**, 2014.

CRESPO-LÓPEZ, M. E.; MACÊDO, G. L.; PEREIRA, S. I.; ARRIFANO, G. P.; PIKANÇO-DINIZ, D. L.; DO NASCIMENTO, J. L.; HERCULANO, A. M. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacological Research**, **60**: 212–220. 2009.

DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L. C.; VICENTINI, V. E. P. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **Revista de Saúde e Biologia**, **7**: 66-81. 2012.

ELLIS, P.; FOWLER, P.; BOOTH, E.; KIDD, D.; HOWE, J.; DOHERTY, A.; SCOTT, A. Where will genetic toxicology testing be in 30 years' time? Summary report of the 25th Industrial Genotoxicity Group Meeting, Royal Society of Medicine, London, November 9, 2011. **Mutagenesis**, **29**: 73–77. 2013.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability dysfunction and cell death. **Mutation Research**, **600**: 58-66, 2006.

GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, **90**: 2315-2336. 2016.

HA, E.; BASU, N.; O'REILLY, S. B.; DÓREA, J. G.; SORLEY, E. M.; SAKAMOTO, M.; CHAN, H. M. Current progress on understanding the impact of mercury on human health. **Environmental Research**, **152**: 419-433. 2016.

HO, Y. B.; ABDULLAH, N. H.; HAMSAN, H.; TAN, E. S. S. Mercury contamination in facial skin lightening creams and its health risks to user. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, **88**: 72-76. 2017.



KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. **Journal of Hazardous Materials**, **306**: 376-385.2015.

KIMURA, A.; MIYATA, A.; HONMA, M. A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. **Mutagenesis**, **28**: 583–590. 2013.

MAUÉS, L. A. L.; MACCHI, B. M.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; NASCIUTTI, L. E.; PICANÇO-DINIZ, D. L. W.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; NASCIMENTO, J. L. M. Methylmercury inhibits prolactin release in a cell line of pituitary origin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **48**: 691-696. 2015.

NERSESYAN, A.; KUNDI, M.; WALDHERR, M.; SETAYESH, T.; MISÍK, M.; WULTSCH, G. FILIPIC, M.; BARCELOS, G.; KNASMUELLER, S. Results of micronucleus assays with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cádmium. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, **770**: 119-139. 2016.

di PAOLO, C. **Aplicação do Ensaio Cometa de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à  $\beta$ -naftoflavona**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006. 103p.

PETRONI, D.; TSAI, J.; MONDAL, D.; GEORGE, W. Attenuation of Low Dose Methylmercury and Glutamate Induced-Cytotoxicity and Tau Phosphorylation by an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Human Neuroblastoma (SHSY5Y) Cells. **Environmental Toxicology**, **28**: 700-706. 2013.

PIRRONE, N.; CINNIRELLA, S.; FENG, X.; FINKELMAN, R. B.; FRIEDLI, H. R.; LEANER, J.; MASON, R.; MUKHERJEE, A. B.; STRACHER, G. B.; STREETS, D. G.; TELMER, K. Global Mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. **Atmospheric Chemistry and Physics**, **1010**: 5951–5964. 2010.

PU, X.; WANG, Z.; KLAUNIG, J. E. Alkaline comet assay for assessing DNA damage in individual cells. **Current Protocols in Toxicology**. 2015.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDAI, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, **6**: 317-320. 2003.

ROSALES-RIMACHE, J. A.; MALCA, N. E.; ALARCÓN, J. J.; CHÁVEZ, M.; GONZÁLES, M. A. Daño genotóxico en trabajadores de minería artesanal expuestos al mercurio. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, **30**: 595-600. 2013.

SALES, C. S. S.; GUIMARÃES, P. A. R.; **Avaliação dos possíveis efeitos mutagênicos e/ou genotóxicos do metil mercúrio em linhagens celulares e sua relação com os estudos acerca da legislação vigente.** Trabalho de Conclusão de Curso. UEPA. Centro de Ciências Naturais e Tecnologia. 2012.

SANTOS, B. A. Recursos minerais da Amazônia. **Estudos avançados**, **16**. 2002.

SIQUEIRA, G. W.; APRILE, F. M. Distribuição de mercúrio total em sedimentos da Plataforma Continental Amazônica – Brasil. **Acta amazônica**, **42**(2): 259-268. 2012.

SOTO-RÍ, M. L.; ROTHENBERG, S.; GONSEBATT, M. E.; TALAVERA-MENDOZA, O. Cytogenotoxicity in uroepithelial cells of women exposed to mercury in a mining area. **Occupational and Environmental Medicine**, **67**: 620-624. 2010.

TORRES-BUGARÍN, O.; ROMERO, N. M.; IBARRA, M. L. R.; FLORES-GARCÍA, A.; ABURTO, P. V.; ZAVALA-CERNA, M. G. Genotoxic Effect in Autoimmune Diseases Evaluated by the Micronucleus Test Assay: Our Experience and Literature Review. **BioMed Research International** . 2015.

WATANABE, J.; NAKAMACHI, T.; OHTAKI, H.; NAGANUMA, A.; SHIODA, S.; NAKAJO, S. Low dose of methylmercury (MeHg) exposure induces caspase mediated-apoptosis in cultured neural progenitor cells. **The Journal of Toxicological Sciences**, **38**: 931-935. 2013.

WU, M. L.; DENG, J. F.; LIN, K. P.; TSAI, W. J. Lead, Mercury, and Arsenic Poisoning Due to Topical Use of Traditional Chinese Medicines. **The American Journal of Medicine**, **126**. 2013.

WU, X.; COBBINA, S. J.; MAO, G., XU, H.; ZHANG, Z., YANG, L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**. 2016.

YE, B. J.; KIM, B. G.; JEON, M. J.; KIM, S. Y.; KIM, H. C.; JANG, T. W.; CHAE, H. J.; CHOI, W. J.; HA, M. N.; HONG, Y. S. Evaluation of mercury exposure level, clinical

diagnosis and treatment for mercury intoxication. **Annals of Occupational and Environmental Medicine**, **28**. 2016.

YNALVEZ, R.; GUTIERREZ, J.; GONZALEZ-CANTU, H. Mini-review: toxicity of mercury as a consequence of enzyme alteration. **BioMetals**, **29**: 781-788. 2016.

ZHUA, X.; QIN, H.; LIU, J.; ZHANG, Z.; LU, Y.; YUAN, X.; WU, D. A novel electrochemical method to evaluate the cytotoxicity of heavy metals. **Journal of Hazardous Materials**, **271**: 210-219. 2014.

ZIMMERMANN, L. T.; SANTOS, D. B.; NAIME, A. A.; LEAL, R. B.; DÓREA, J. G.; JUNIOR, F. B.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B T.; FARINA, M. Comparative study on methyl- and ethylmercury-induced toxicity in C6 glioma cells and the potential role of LAT-1 in mediating mercurial-thiol complexes uptake. **Neurotoxicology**, **38**:1-8. 2013.