

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ATRAZINA SOBRE AS CÉLULAS DE BETA INSULINOMA DE RATO INS-1E, EXPOSIÇÃO REPETIDA E AGUDA

Palavras-Chave: ATRAZINA, CITOTOXICIDADE, CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS

Autores/as:

Silvia Maria Ferreira dos Santos [UNICAMP]

Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus (orientador) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

Nos extensos campos de monocultura localizados em território brasileiro ocorre a pulverização em larga escala de agrotóxicos, que causam danos ao solo, água superficial, água da chuva, ar e alimentos que consumimos e também para as pessoas que têm contato como trabalhadores rurais e quem reside perto das plantações (Pignatti et al. 2017). Existem estudos que comprovam a presença de agrotóxicos acima do limite permitido por lei em água utilizada para consumo humano, além da presença em alimentos, muitos desses agrotóxicos são proibidos em diversas partes do mundo mas seguem sendo utilizados livremente por aqui. Muitos destes compostos estão presentes em quantidades suficientes para causar danos à saúde de quem consome os produtos contaminados (Panis et al. 2022).

A atrazina (ATZ) (1-Chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine) é altamente solúvel em água e muito utilizado no plantio de cana de açúcar e milho. Apesar de se tratar de um herbicida antigo (é proibido seu uso na Alemanha desde 1991), ainda assim é amplamente utilizado no Brasil devido ao seu baixo custo, e ao fato de atuar juntamente com outros compostos, o que facilita sua ampla utilização nas lavouras (Bula Atrazina SD 500 SC - SHARDA). Seu uso no Brasil corresponde a 4,6% da quantidade total de herbicidas aplicados (IPEA, 2019). Porém, os impactos da ATZ vão além do dano ecológico, esse composto também é bastante danoso para o ser humano, causando doenças que são desenvolvidas após a intoxicação e seguem quem foi contaminado por um longo tempo ou até mesmo a vida toda. Os danos já conhecidos dessa substância são relativos à perda ou prejuízo na audição (Matiazzi, 2019), distúrbios endócrinos como redução do TNF- α , IL-1 β e vias do receptor de estrogênio que podem levar ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Pizatti et al, 2020), disfunção epigenética por meio da redução das atividades de manutenção da enzima DNA metiltransferase (DNMT) (Wirbisky-Hershberger et al, 2017), ela também atua como um desregulador endócrino ao inibir a fosfodiesterase-4 específica do AMPc, exposição a longo prazo contribui para o desenvolvimento de doenças metabólicas resultando em resistência à insulina e obesidade (Gupta et al, 2020). Portanto, aprofundar o entendimento dos efeitos citotóxicos em modelos celulares de células do sistema endócrino é importante para entender melhor os efeitos tóxicos desse agrotóxico.

Neste presente estudo busca-se conhecer os efeitos citotóxicos da ATZ em diferentes concentrações nas células beta pancreáticas INS-1E (insulinoma de rato) e comparar os efeitos da exposição aguda e repetida. Para isso, iniciamos então utilizado diversos ensaios

para que seja encontrado o que melhor representa os efeitos citotóxicos exercidos pela ATZ, sendo eles ensaio de MTT, vermelho neutro (VN) e também para efeitos comparativos o efeito de um inibidor ciclohexamida (CHX).

METODOLOGIA:

Todos Os ensaios foram realizados utilizando as células beta pancreáticas (INS-1E) que foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm², contendo meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino 5%, 10 mM de Hepes, 1 mM de piruvato de sódio, 50 µM de 2-mercaptoetanol e antibiótico - 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Brasil), citado nesse trabalho como meio de cultura suplementado. As células foram mantidas a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂ em incubadora Panasonic COM-170AICUVL-PA.

Ensaio de Vermelho Neutro (VN)

Para teste de viabilidade celular foi realizado um ensaio utilizando o vermelho neutro (VN), a primeira etapa realizada foi o plaqueamento das células, para isso foi realizada a contagem do número de células por ml e posteriormente encontrado o valor em microlitros que deveria ser diluído a fim de ter o valor final de 15.000 células por poço, após o plaqueamento a placa foi incubada por 48 horas para aderência celular. Após esse período foi realizado o tratamento da placa com ATZ, para isso foi realizada uma diluição seriada (920 µM- 0,011µM), partindo-se de uma solução estoque (D1) de 920 µM, foi realizada uma diluição na proporção 200:1200 até chegar ao valor 0,011 µM (D8), em cada transferência foi realizado o movimento de up down para a completa homogeneização. O conteúdo dos poços é sugado e é adicionado o conteúdo dos eppendorfs sendo cada diluição utilizada em uma coluna da placa, posteriormente a placa foi incubada por 24 horas. Então foi realizada a última etapa, é então preparada uma solução de vermelho neutro onde 12 ml de meio é adicionado 120 µl de solução estoque de vermelho neutro, após remover o conteúdo da placa é adicionado 100 µl conteúdo da solução de vermelho neutro em cada poço e a placa é incubada por 2 horas, novamente o conteúdo da placa substituído por 150 µl de solução revelação (49 % água miliq, 50% álcool 96% e 1% ácido acético glacial) nos poços, a placa ficou no agitador por 3 minutos. Realizadas essas etapas, a absorbância foi aferida em 540 nm no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). A viabilidade celular foi normalizada em relação ao controle não tratado.

Ensaio de MTT

O protocolo para realização do ensaio de MTT foi dividido em duas partes, sendo a primeira o plaqueamento com as suas subdivisões que são a tripsinização das células e a contagem utilizando a câmara de Neubauer, por fim em cada poço foi plaqueado 15.000 células, a placa foi incubada por 48 horas para aderência celular. A etapa seguinte que foi realizada foi a de diluição seriada a partir da solução estoque 400 µM de ciclohexamida (CHX) em 2000 µl de meio, as diluições seriadas foram realizadas em eppendorfs de 2 ml (no total foram utilizados 8), foi adicionado 500 µl nos eppendorfs de número D2 a D4 de meio de cultura puro, 600 µl em D5 e 900 µl nos D6 a D8, e da solução mãe é retirado 500 µl e transferido para o eppendorf de número D2 foi realizado *up and down* para homogeneizar a solução é então transferido 500 µl deste para o D3, 500 µl deste para o D4, 400 µl para D5, 100 µl para D6 e o mesmo para D7 e D8. Posteriormente foi realizado o plaqueamento propriamente das soluções de tratamento, utilizando cada coluna para uma dessas concentrações totalizando assim 8 colunas (a solução mãe também utilizada), 2 colunas são

preenchidas com meio de cultura não suplementado e funcionam como controle. A placa foi incubada por 24 horas. Já a terceira parte se trata do ensaio de redução do MTT, primeiro a solução de tratamento é removida da placa e depois adicionado MTT dissolvido em meio de cultura e a placa foi incubada por 3 horas, e após verificar a formação dos cristais de formazan com o uso do microscópio, o conteúdo da placa foi então substituído por 150 μ l DMSO, a placa ficou no agitador por 3 minutos. Realizadas essas etapas, a absorbância foi aferida em 540 nm no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). A viabilidade celular foi normalizada em relação ao controle não tratado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Iniciamos a avaliação da toxicidade da ATZ usando a exposição aguda (24 horas) no ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular, posteriormente foi realizado o ensaio de VN e o ensaio de MTT com uma substância (CHX) com efeito inibidor já conhecido para efeito de comparação com os testes realizados com ATZ. O primeiro ensaio realizado para encontrar os valores de viabilidade celular foi o MTT, o resultado encontrado está representado na figura 1, é possível observar que os resultados encontrados neste ensaio não representam adequadamente os valores reais. Foi então realizado o experimento para determinação do IC₅₀ em triplicata, ou seja, foi realizado três vezes independentes, com exposição a ATZ por um período de 24 horas (exposição aguda) e foi feita a análise da viabilidade celular por meio do ensaio de VN. O valor máximo de ATZ encontrado na solução com maior concentração é limitado pela questão da solubilidade da ATZ no meio de cultura. O resultado encontrado demonstra alta viabilidade celular apesar do tratamento, mesmo na concentração mais alta a taxa de viabilidade celular ficou em aproximadamente 80% o que é um valor alto levando em consideração a quantidade de ATZ ao qual as células foram expostas. Segundo Liu et al. a citotoxicidade aumenta com o passar do tempo, ou seja em uma exposição prolongada foi encontrado menor viabilidade celular, por isso é necessário que seja realizado estudos em que a exposição a ATZ seja de até 72h como encontrado neste estudo.

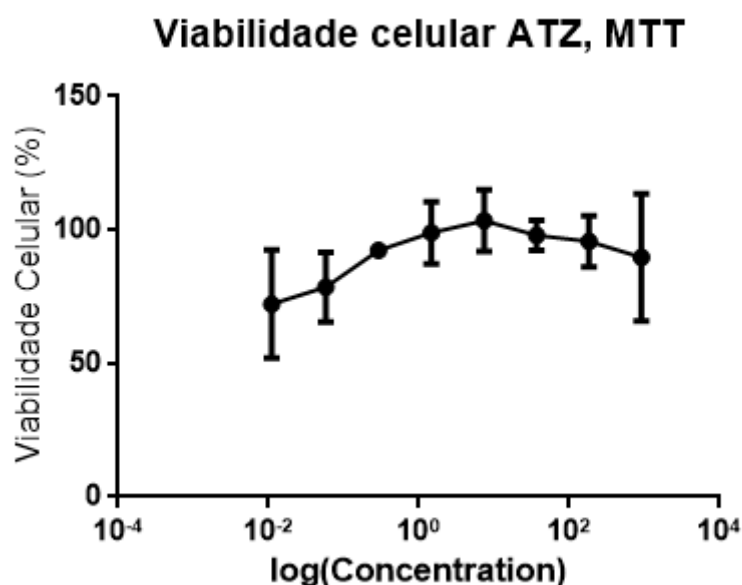


Figura 1- Determinação do IC₅₀ da ATZ em células beta pancreáticas. As células foram tratadas com concentrações crescentes de ATZ (0,011 – 920 μ M) por um período de 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. A viabilidade de células não tratadas foi considerada como 100%. Cada valor representa a média $\pm$ S.D. de três experimentos independentes (n = 4).

Viabilidade Celular ATZ

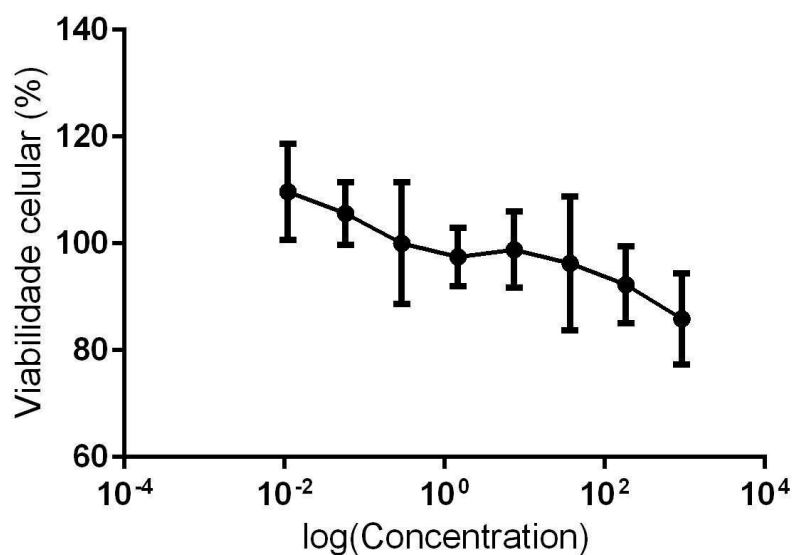


Figura 2- Determinação do IC50 da ATZ em células beta pancreáticas. As células foram tratadas com concentrações crescentes de ATZ (0,011 – 920 μ M) por um período de 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de Vermelho Neutro. A viabilidade de células não tratadas foi considerada como 100%. Cada valor representa a média $\pm$ S.D. de três experimentos independentes (n = 4).

Viabilidade Celular CHX

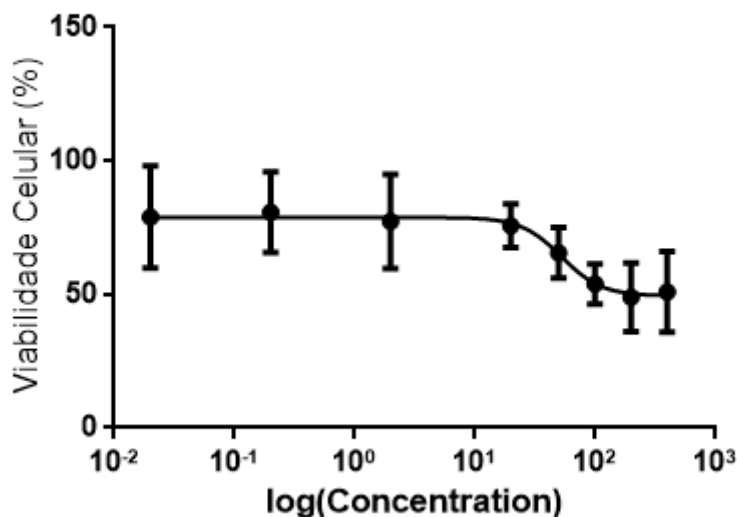


Figura 3- Determinação do IC50 da CHX em células beta pancreáticas. As células foram tratadas com concentrações crescentes de CHX (0,02 – 400 μ M) por um período de 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. A viabilidade de células não tratadas foi considerada como 100%. Cada valor representa a média $\pm$ S.D. de três experimentos independentes (n = 4).

Para efeito de comparação foi utilizado a CHX que é um inibidor da síntese de proteínas o que leva a morte celular, para observar o efeito que o mesmo causa sobre as

INS-1E, como pode ser observada no gráfico a taxa de viabilidade celular caiu em relação ao tratamento com ATZ, chegando a 50% na concentração de 400 µM (maior concentração).

CONCLUSÕES:

Conclui-se que a célula beta pancreática (INS-1E) é pouco sensível ao tratamento com ATZ nas concentrações apresentadas no período de 24 horas ou seja exposição aguda, é necessário mais estudos para verificar se o mesmo ocorre em exposições a um período maior (48 horas, 72 horas) e assim ver como as células irão se comportar em relação ao agente tóxico. Além da determinação de IC50 em exposições mais prolongadas, o estudo ainda prevê novos testes para verificação de dano ao DNA e função da concentração de cálcio nas células.

BIBLIOGRAFIA

PIGNATTI, W. A. et al. **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde.** Ciência & Saúde Coletiva [online]. 2017, v. 22, n. 10 [Acessado 5 Julho 2022], pp. 3281-3293. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/grnnBRDjmtcBhm6CLprQvN/?lang=pt><<https://doi.org/10.1590/>.

PANIS, C., CANDIOTTO, L.Z.P., GABOARDI, S.C. **Permissiveness of Brazilian Legislation, Widespread Contamination by Pesticides in Food and Water, and Risks to the Population's Health.** FRONTIERS IN ENVIRONMENTAL SCIENCE. Mai. 2022. 10.3389/fenvs.2022.926434. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2022.926434/full>. Acesso em: Jun. 2022.

WIRBISKY SE, Freeman JL. **Atrazine exposure elicits copy number alterations in the zebrafish genome.** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2017 Apr;194:1-8. doi: 10.1016/j.cbpc.2017.01.003. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28111253; PMCID: PMC5325771.

SHARDA. **BULA: ATRAZINA SD 500 SC.** https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/atrazinasd500sc.pdf

GUPTA, R.. KUMAR, P.. FAHMI, N.. GARG, B.. DUTTA, S.. SACHAR, S.. MATHARU, A.. KARANI, V.. (2020). **Endocrine Disruption and Obesity: A current review on Environmental Obesogens.** Current Research in Green and Sustainable Chemistry. Vol, 3. Junho, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.06.002>.

WIRBISKY S.E, FREEMAN J.L. **Atrazine exposure elicits copy number alterations in the zebrafish genome.** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2017 Apr;194:1-8. doi: 10.1016/j.cbpc.2017.01.003. Epub 017 Jan 19. PMID: 28111253; PMCID: PMC5325771.

LIU XM, SHAO JZ, XIANG LX, CHEN XY. **Cytotoxic effects and apoptosis induction of atrazine in a grass carp (Ctenopharyngodon idellus) cell line.** ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY Vol.21. Fev 2006. DOI10.1002/tox.20159.