



XXXI Congresso de
Iniciação Científica
----- Unicamp

2023



AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DANO MITOCONDRIAL CAUSADO PELA ATRAZINA NAS CÉLULAS BETA DE INSULINOMA DE RATO INS-1E

Palavras-Chave: ATRAZINA, ESTRESSE OXIDATIVO, CÉLULAS BETA DE INSULINOMA

Autores(as):

SILVIA MARIA FERREIRA DOS SANTOS, IB – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). MARCELO BISPO DE JESUS (orientador), IB - UNICAMP

1. Introdução

As condições climáticas brasileiras são favoráveis à produção agrícola e aliados à grande quantidade de terras disponíveis torna assim o Brasil um grande produtor agrícola sendo o segundo maior exportador de produtos agrícolas. Agrotóxicos são usados em grande quantidade nos campos, devido a sua alta eficiência, preços baixos e uma legislação permissiva. (Brovini et al, 2021)

Dentre os agrotóxicos mais comumente utilizados está a atrazina (ATZ) (1-Chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine) é um composto altamente solúvel em água e muito utilizado no plantio de cana de açúcar e milho. 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.

Para a determinação da toxicidade da ATZ foi utilizado um teste de viabilidade celular, o teste utilizado foi o vermelho neutro. O vermelho neutro é um

dos testes de viabilidade bastante utilizado, sua função é baseada na sua capacidade de incorporar e se com às células viáveis onde esse corante fracamente catiônico penetra as membranas celulares por difusão passiva e ele se concentra nos lisossomos se ligando por ligações eletrostáticas a grupos aniônicos e ou fosfato da matriz lisossomal (Repetto et al, 2008).

Neste presente estudo busca-se avaliar os efeitos citotóxicos da ATZ em diferentes concentrações nas células beta pancreáticas na exposição de 48 horas, para isso foi utilizado o ensaio de vermelho neutro, já comprovado o método mais eficiente no estudo realizado anteriormente. Foi também realizado visando continuar a obtenção de dados do estudo anterior o Ensaio Cometa que visa avaliar os danos genotóxicos da ATZ.

2. Material e métodos

2.1 Cultura de Células

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 neste trabalho como meio de cultura suplementado. As células foram mantidas a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂ na incubadora Panasonic COM-170AICUVL-PA.

2.2 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 mililitros 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. Em cada coluna da placa foi utilizada uma das concentrações de ATZ que variavam entre 0,011 – 920 µM, totalizando 8 diluições. Foi então preparada uma solução de vermelho neutro onde 12 ml de meio foi adicionado 120 µl de solução estoque de vermelho neutro (4 mg/ml) dissolvido em PBS, após remover o conteúdo da placa foi adicionado 100 µl da solução de vermelho neutro em cada poço e a placa foi incubada por 2 horas, novamente o conteúdo da placa removido e adicionado 150 µl de solução revelação nos poços, a placa ficou no agitador por 3

minutos. Realizadas essas etapas a placa pôde ser lida a absorbância a 540 nm no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Os valores foram expressos em porcentagens de redução do vermelho neutro em relação ao controle (que foi considerado o valor 100%).

2.3 Teste cometa

Para teste de dano ao DNA foi utilizado o teste cometa, na primeira etapa foi realizada a preparação das soluções estoque, sendo elas a de solução de lise e solução de EDTA. No dia da realização do teste cometa é preparado as soluções de uso, sendo elas: solução de lise, tampão de eletroforese e solução tampão de neutralização. Foi preparado as lâminas primeiramente utilizando agarose de ponto de fusão normal, Na segunda parte da preparação das lâminas foi adicionado às células INS-1E que receberam o tratamento padrão deste estudo que são concentrações crescentes de ATZ (0,011 – 920 μ M) por um período de 24 h, as células foram então tripsinizadas e acondicionadas em eppendorfs e por fim centrifugadas para gerar um “pellet” (5×10^4) que foram misturadas a agarose Low Melting de baixo ponto de fusão e adicionadas sob lâminas contendo agarose de ponto de fusão normal. Foi realizada a etapa de lise para o rompimento das membranas e sequencialmente uma corrida em eletroforese por 20 minutos a 25V e 300Kva em solução tampão alcalina. Por fim as células foram neutralizadas e fixadas em álcool etílico 100%. As lâminas foram coradas com uma solução de Gel Red 1x, e analisadas em microscópio de fluorescência no aumento de 400x. Foram analisadas 100 células por grupo experimental. Os núcleos celulares foram classificados em uma classe de dano que é determinada de acordo com a intensidade e tamanho da cauda do cometa e submetidos a fórmula para determinar o índice de danos, seguindo o protocolo de KOBAYASHI (1995).

3. Resultados e discussão

Inicialmente foram realizados experimentos que buscavam dar continuidade ao que foi que foi iniciado na primeira parte desta pesquisa, buscando assim a corroboração ou refutar os dados encontrados na primeira iniciação científica. Na pesquisa anterior foi encontrado na exposição de 48 horas foi notado uma diminuição da viabilidade celular para 67% na maior concentração de ATZ, na atual pesquisa a viabilidade encontrada é de 79% na maior concentração de ATZ, um valor relativamente próximo, para encontrar um resultado que corrobora a hipótese

seria necessário a realização de mais um teste de viabilidade para completar os 3 necessários.

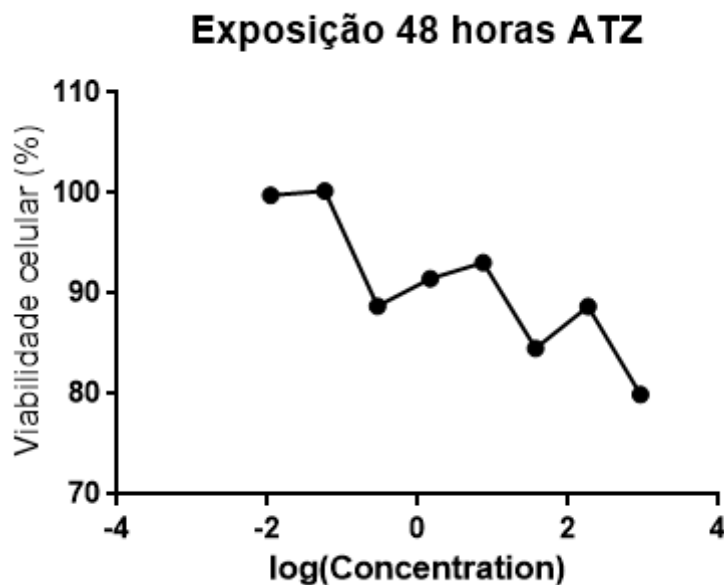


Figura 1- Determinação do IC50 da ATZ em células beta pancreáticas INS-1E. As células foram tratadas com concentrações crescentes de ATZ (0,011 – 920 μ M) por um período de 48 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de Vermelho Neutro. A viabilidade de células não tratadas foi considerada como 100%. O experimento foi realizado uma vez, que é representado no gráfico acima.

Ainda dando continuidade aos experimentos do estudo anterior foi realizado o Ensaio Cometa para verificar se a exposição a ATZ causa dano ao DNA, já que no estudo anterior foi detectado que a ATZ causa dano a célula e o presente estudo busca conhecer os componentes da célula que sofrem dano, sendo assim o experimento foi realizado uma vez porém o resultado obtido na análise de dados no microscópio não foi satisfatório, um número muito baixo de células aderiram as lamínulas e as poucas células analisadas não apresentaram a coloração necessária. Portanto, não foi possível realizar as análises e, infelizmente, não foram adquiridas nenhuma imagem para registrar esses problemas, pois acreditávamos que teríamos tempo para repetir o experimento antes do relatório.

5. Conclusões

Nossos dados de citotoxicidade corroboram os dados do primeiro ano, onde observamos que altas doses de ATZ causam uma diminuição significativa da

toxicidade das células beta pancreáticas INS-1E. Trabalhos futuros serão necessários para elucidar os mecanismos dessa toxicidade.

Durante o primeiro semestre do segundo ano foram encontrados alguns contratempos com a cultura de células, em particular, demoram uma semana para crescer, e contaminações atrasam de maneira mais significativa do que células convencionais. Além disso, a implementação de um protocolo novo sempre requer um tempo e o desenvolvimento de novas habilidades, o que também causou um certo atraso, e infelizmente, problemas pessoais impossibilitaram a finalização dessa etapa do projeto. Em virtude das dificuldades encontradas, a aluna e o orientador decidiram de comum acordo encerrar a bolsa. Mas ainda assim, acreditamos que esse um ano e meio foi muito importante para a formação profissional da aluna, contribuindo para o aprendizado em diversas técnicas laboratoriais (por ex. cultura de células) e habilidades (por ex. trabalho em grupo).

6. Referências bibliográficas

BROVINI E.M., DEUS B.C.T., VILAS-BOAS J.A., QUADRA G.R., CARVALHO L., MENDONÇA R.F., PEREIRA R.O., CARDOSO S.J. **Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks.** Science of The Total Environment, Volume 771, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>.

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

MORAES, R.F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória.** Instituto de Pesquisas Econômicas Aplicadas. 2019. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf. Acesso em: 8 mai. 2023

PAOLO, C.D. **Aplicação do Ensaio Cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, Centropomus parallelus (Poey, 1860), expostos a β -naftoflavona.** Dissertação de mestrado. São Paulo, 2006. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21131/tde-17102006-154149/publico/CarolinaDiPaolo.pdf> . Acesso em: 8 mai. 2023.