

AVALIAÇÃO DO EFEITO REPROTÓXICO APÓS EXPOSIÇÃO A HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) EM CAENORHABDITIS ELEGANS.

Nariani Rocha Saraiva¹

Solange Cristina Garcia²

Gabriela Göethel³

Daiana Avila⁴

Marcell V Soares⁵

Resumo:

Introdução: Atualmente, nos encontramos ao redor de um ambiente repleto de poluentes ambientais, resultantes de processos industriais, queima de combustíveis e fumaça do cigarro, dentre os quais, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) estão envolvidos. Devido a tal cenário, se faz importante investigar os efeitos das exposições por estes compostos. Impactos à saúde foram evidenciados, dentre os mais alarmantes, destaca-se a capacidade destes poluentes causarem danos ao DNA. Neste estudo os HPAs utilizados são benzo(a)pireno e benzo(a)fluoranteno, reconhecidos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) como carcinogênicos e 2-nitrofluoreno e fluoreno, classificados como um possíveis carcinogênicos. **Objetivo:** Nesse contexto o trabalho busca avaliar o impacto da exposição crônica aos hidrocarbonetos avaliando parâmetros reprodutivos utilizando o modelo *Caenorhabditis elegans*. **Materiais e Métodos:** A cepa utilizada foi a tipo selvagem N2 Bristol. Os vermes em L1 foram expostos aos compostos em meio líquido por 12 horas, utilizando as concentrações de 10, 25 e 200 mg/L para 2-nitrofluoreno, 10, 50 e 300 mg/L para benzo(a)pireno, 5, 50 e 300 mg/L de benzo(a)fluoranteno e 25, 50 e 300 mg/L de fluoreno. Logo após a exposição, os vermes postos em placas com meio de cultivo NGM e *Escherichia coli* OP50 por 48 horas em incubadora a 20°C. Após as 48 horas, 1 verme de cada grupo foi transferido para placas de petri NGM com *Escherichia coli* OP50. Foi realizada a contagem do número de ovos postos e, no dia seguinte, o número respectivo de larvas eclodidas, sendo que a cada novo dia os vermes foram transferidos para novas placas NGM para avaliação diária deste parâmetro, ao final efetuado cálculo da taxa de viabilidade reprodutiva dos vermes. **Resultados:** Foi observado que exposição ao benzo(a)pireno apresentou maior toxicidade, sendo que em todas as concentrações o número de ovos reduziu significativamente, já o número de larvas foi menor apenas na concentração de 300 mg/L. Os vermes expostos ao 2-nitrofluoreno, apresentaram uma redução no número de ovos e larvas apenas na concentração de 200 mg/L. exposição ao fluoreno apenas 25 mg/L reduziu numero de ovos, larvas e viabilidade significativamente, enquanto que benzo(a)fluoranteno não demonstrou efeitos tóxicos.

Ambos compostos demonstraram não apenas reduzir a progénie, bem como demonstram um efeito embriotóxico, visto que a exposição nas maiores concentrações observou-se uma diminuição significativa na viabilidade reprodutiva. Conclusão: com base nos resultados encontrados, observa-se que estes compostos demonstram elevado carácter tóxico, em particular no trabalho aqui apresentado, sobre parâmetros reprodutivos.

Palavras-chave: hidrocarbonetos, toxicidade, reprodução

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DO EFEITO REPROTÓXICO APÓS EXPOSIÇÃO A HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) EM CAENORHABDITIS ELEGANS.

¹ Aluno de graduação. narisaraiva97@gmail.com. Autor principal

² PQ. solangegarcia@gmail.com. Co-autor

³ PQ. gabrielaGoethel@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. avilads1@gmail.com. Orientador

⁵ PG. marcellfarma@gmail.com. Co-orientador

AVALIAÇÃO DO EFEITO REPROTÓXICO APÓS EXPOSIÇÃO A HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM *Caenorhabditis elegans*.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o processo de combustão de variados tipos de materiais tem sido o principal contribuinte para a poluição atmosférica, gerando desequilíbrio no ambiente, ocasionando um grande problema em saúde pública (WATKINS; KLAASSEN, 2012). Como exemplo disso, destacamos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), considerados poluentes com potencial carcinogênico (ARMSTRONG et al., 2004; ZASADOWSKI; WYSOCKI, 2002).

Estes hidrocarbonetos gerados devido à combustão incompleta de carvão, cigarro bem como combustíveis, são liberados para o ambiente. Além disso, estão presentes no material utilizado para produção do asfalto, e sob aquecimento, volatilizam na formação de vapor, sendo facilmente absorvidos por via respiratória, assim promovendo efeitos tóxicos aos expostos (FIALA et al., 1999; SAMANTA; SINGH; JAIN, 2002).

A agência internacional de pesquisa sobre o câncer (IARC) classifica alguns HPAs como carcinogênicos, tais como benzopireno e benzo(a)fluoranteno. Outros são possivelmente carcinogênicos como fluoreno e 2-nitrofluoreno (HUMANS, 2010). A literatura confirma os riscos da exposição aos HPAs, causando problemas à saúde, como asma (KLINGBEIL et al., 2014), efeitos na reprodução (BOLDEN et al., 2017) e como já citado câncer (ANDREOTTI; SILVERMAN, 2012; BRODY; RUDEL, 2003; YU, 2002).

Dentro deste contexto o presente trabalho busca avaliar o efeito da exposição aos HPAs sobre parâmetros reprodutivos no modelo complementar *Caenorhabditis elegans*. O *C. elegans* tem sido utilizado como organismo modelo devido à grande semelhança genética que existe entre estes nematoides e os mamíferos (KALETTA; HENGARTNER, 2006).

2. METODOLOGIA

A cepa utilizada neste projeto foi a tipo selvagem N2 Bristol obtida no *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) utilizados no trabalho foram benzopireno, 2-nitrofluoreno, benzo(a)fluoranteno e fluoreno todos obtidos na Sigma-Aldrich.

As concentrações dos HPAs foram fixadas conforme curvas dose-resposta previamente realizadas, sendo estabelecidas as concentrações de 10, 50 e 300 mg/L para benzopireno; 10, 25 e 200 mg/L para 2-nitrofluoreno; 5, 50 e 300 mg/L para benzo(a)fluoranteno e 25, 50 e 300 mg/L de fluoreno. Ordem de letalidade aos hidrocarbonetos encontrada foi benzo(a)fluoranteno, 2-nitrofluoreno, fluoreno e benzopireno respectivamente.

1.000 vermes L1 em um volume de 100 µL foram transferidos para eppendorfs na presença de solução salina (NaCl 0,5%) 800 µL, caldo com bactéria *Escherichia coli* OP50 50 µL e finalmente 50 µL dos tratamentos, totalizando um volume final de 1mL. Após, os eppendorfs selados com parafilm, foram colocados em um homogeneizador automático e em uma incubadora com controle de temperatura (20°C) por 12 horas.

Posteriormente, foram efetuadas quatro lavagens com água destilada e os vermes postos em placas com meio de cultivo NGM com *Escherichia coli* OP50 por 48 horas em incubadora a 20°C.

Após as 48 horas, 1 verme de cada grupo controle/tratado foi transferido para placas de petri NGM com *Escherichia coli* OP50 em triplicata, durante o período fértil dos vermes, foi realizada a contagem do número de ovos postos e, no dia seguinte, o número respectivo de

larvas eclodidas, sendo que a cada novo dia os vermes foram transferidos para novas placas NGM para avaliação diária deste parâmetro, ao final também foi calculada a taxa de viabilidade reprodutiva dos vermes.

Os gráficos e a análise estatística foram criadas usando o software GraphPad Prisma versão 6, os dados serão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Diferenças entre os grupos tratados e grupos controles serão determinadas utilizando análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguido por um *pós-teste* apropriado. Um valor de p inferior a 0,05 será considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura (1) mostra a contagem de ovos e larvas após exposição ao benzopireno, foi observado que em todas as concentrações utilizadas houve uma redução significativa no número de ovos postos ($p < 0,05$) e apenas na concentração de 300 mg/L observamos diminuição no número de larvas de maneira significativa ($p < 0,05$). Ao lado demonstramos que 300 mg/L também gerou redução significativa ($p < 0,01$) na viabilidade reprodutiva.

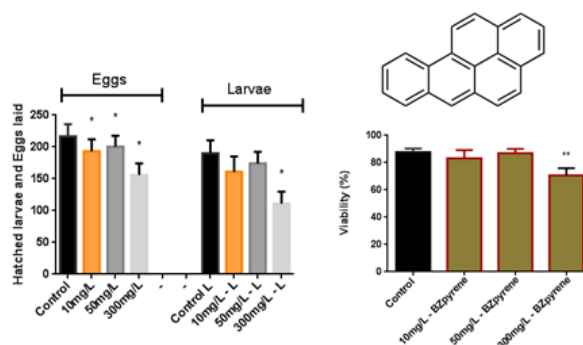


Figura 1. Avaliação do parâmetro de reprodução durante o período fértil dos vermes, após 12h de exposição ao benzopireno. Apresentamos no gráfico a esquerda uma contagem dos ovos postos e larvas eclodidas e a direita um gráfico representando a viabilidade dos ovos. A significância foi determinada usando o teste ANOVA de duas vias, seguido por *post hoc* de Tukey. Símbolos mostram diferenças significativas dos grupos tratados em comparação com o seu respectivo grupo controle: *, $p < 0.05$ e **, $p < 0.01$.

Na figura (2) apresentamos os resultados obtidos após exposição ao 2-nitrofluoreno, observamos que apenas a concentração de 200 mg/L diminui significativamente ($p < 0,05$) o número de ovos postos e que nas concentrações de 10 e 200 mg/L houve redução significativa ($p < 0,05$) no número de descendentes. Analisando a taxa de viabilidade reprodutiva, apenas a exposição a 200 mg/L gerou maior número de ovos inviáveis significativamente ($p < 0,05$).

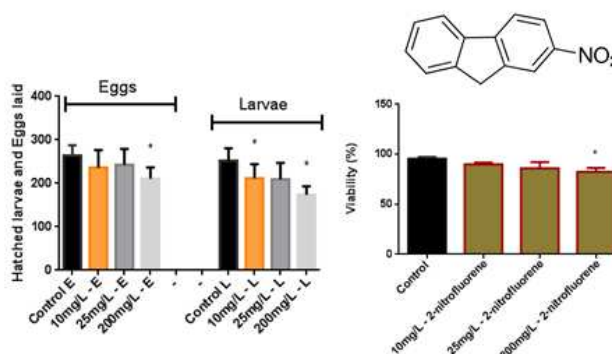


Figura 2. Avaliação do parâmetro de reprodução durante o período fértil dos vermes, após 12h de exposição ao 2-nitrofluoreno. No gráfico a esquerda mostramos uma contagem dos ovos postos e larvas eclodidas e ao lado um gráfico representando a viabilidade dos ovos. A significância foi determinada usando o teste ANOVA de duas vias, seguido por *post hoc* de Tukey. Símbolos mostram diferenças significativas dos grupos tratados em comparação com o seu respectivo grupo controle: *, $p < 0.05$.

Exposição ao benzofluoranteno foi a que apresentou os efeitos menos tóxicos em relação à reprodução como observado na figura (3). Foi observado que apenas a concentração de 5 mg/L gerou uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de larvas eclodidas, porém não demonstrou toxicidade sob o parâmetro de viabilidade.

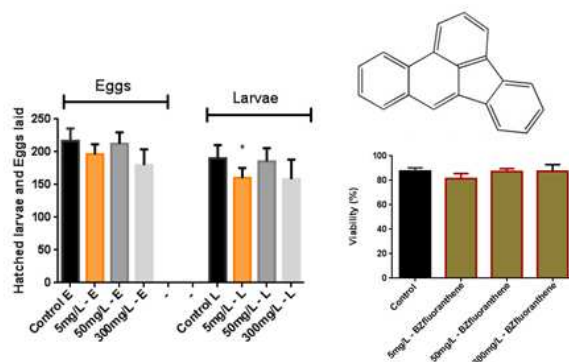


Figura 3. Avaliação do parâmetro de reprodução durante o período fértil dos vermes, após 12h de exposição ao benzofluoranteno. Expomos no gráfico à esquerda uma contagem dos ovos postos e larvas eclodidas e ao lado um gráfico representando a viabilidade dos ovos. A significância foi determinada usando o teste ANOVA de duas vias, seguido por *post hoc* de Tukey. Símbolos mostram diferenças significativas dos grupos tratados em comparação com o seu respectivo grupo controle: *, $p < 0.05$.

Na figura (4) demonstramos resultados obtidos após exposição ao fluoreno, apenas a concentração de 25 mg/L foi capaz de reduzir a quantidade de ovos postos pelos vermes de maneira significativa ($p < 0,05$) e concentrações de 25 e 300 mg/L número de larvas eclodidas foi afetado significativamente ($p < 0,05$). Analisando a taxa de viabilidade observamos que 25 e 50 mg/L demonstraram significativo efeito embriotóxico ($p < 0,01$ e $p < 0,05$; respectivamente).

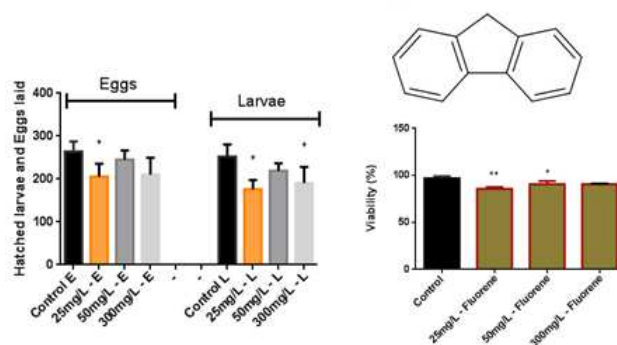


Figura 4. Avaliação do parâmetro de reprodução durante o período fértil dos vermes, após 12h de exposição ao fluoreno. Expomos no gráfico à esquerda uma contagem dos ovos postos e larvas eclodidas e ao lado um gráfico representando a viabilidade dos ovos. A significância foi determinada usando o teste ANOVA de duas vias, seguido por *post hoc* de Tukey. Símbolos mostram diferenças significativas dos grupos tratados em comparação com o seu respectivo grupo controle: *, $p < 0.05$ e **, $p < 0.01$.

Exposição crônica ao benzopireno demonstrou ser mais tóxico sobre a função reprodutiva dos vermes, em relação a benzofluoranteno. Poucos trabalhos utilizando exposição aos HPAs são encontrados, porém, exposição por 72 horas em meio líquido ao benzopireno gera uma redução significativa na progênie quando comparado ao benzofluoranteno, inclusive em concentrações menores se observam efeitos reprotóxicos (SESE; GRANT; REID, 2009). Corroborando, outro trabalho demonstrou que exposição a estes hidrocarbonetos afetou significativamente a reprodução nos vermes (LIUZZI et al., 2012).

Trabalhos recentes utilizando outros modelos experimentais demonstram que benzopireno aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos testículos e também reduz os níveis de hormônios esteroides (SHEWEITA; AL-SHORA; HASSAN, 2016). Outro mecanismo seria a quebra da dupla fita de DNA em oócitos (EINAUDI et al., 2014).

O dano ao DNA é um reconhecido ativador de processos apoptóticos em *C.elegans*, logo, agentes genotóxicos induzem apoptose de células germinativas (GARTNER, ANTON et al., 2000), diferenciação celular dá origem aos oócitos dos vermes, assim, possivelmente alterações da linha germinativa promovem alterações reprodutivas. (GARTNER, A.; BOAG; BLACKWELL, 2008)

A maioria dos HPAs gera danos ao DNA, e trabalhos recentes reafirmam tal suposição, exposição ao benzopireno promove aumento de ROS, aumento da expressão de genes pró-apoptóticos e redução de genes antioxidantes em cultura de células (SARMA; BLAIS; CHAN, 2017), aliado a isso, foi observado danos ao DNA após exposição ao benzopireno (LIAMIN et al., 2017).

Em relação à toxicidade reprodutiva de fluoreno e 2-nitrofluoreno, não há estudos que avaliaram função reprodutiva utilizando *C.elegans* como modelo, no entanto, ambos compostos também possuem potencial tóxico e genotóxico (CUI; ERIKSSON; MOLLER, 1999; TAEHOON et al., 2015).

CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos, foi observado que exposição aos HPAs gerou efeito reprotóxico significativo aos vermes, ressaltando que exposição ao benzopireno em todas as concentrações demonstrou ser mais tóxico, e levando em consideração que apresentou menor letalidade em resultados anteriores, destacamos a importância da realização de diferentes parâmetros para avaliação destes tóxicos, visando assim diferentes ensaios para avaliar com sensibilidade concentrações limites para exposições.

REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, G.; SILVERMAN, D. T. Occupational risk factors and pancreatic cancer: a review of recent findings. **Mol Carcinog**, v. 51, n. 1, p. 98-108, Jan 2012.

ARMSTRONG, B. et al. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. **Environ Health Perspect**, v. 112, n. 9, p. 970-8, Jun 2004.

BOLDEN, A. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and female reproductive health: A scoping review. **Reprod Toxicol**, v. 73, p. 61-74, Oct 2017.

BRODY, J. G.; RUDEL, R. A. Environmental pollutants and breast cancer. **Environ Health Perspect**, v. 111, n. 8, p. 1007-19, Jun 2003.

CUI, X. S.; ERIKSSON, L. C.; MOLLER, L. Formation and persistence of DNA adducts during and after a long-term administration of 2-nitrofluorene. **Mutat Res**, v. 442, n. 1, p. 9-18, Jun 7 1999.

EINAUDI, L. et al. In vivo exposure to benzo(a)pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells. **Hum Reprod**, v. 29, n. 3, p. 548-54, Mar 2014.

FIALA, Z. et al. [Polycyclic aromatic hydrocarbons. I. Environmental contamination and environmental exposure]. **Acta Medica (Hradec Kralove) Suppl**, v. 42, n. 2, p. 77-89, 1999.

GARTNER, A.; BOAG, P. R.; BLACKWELL, T. K. Germline survival and apoptosis. **WormBook**, p. 1-20, Sep 04 2008.

GARTNER, A. et al. A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage–Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. **Molecular Cell**, v. 5, n. 3, p. 435-443, 3// 2000.

HUMANS, I. W. G. O. T. E. O. C. R. T. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v. 92, p. 1-853, 2010.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 05//print 2006.

KLINGBEIL, E. C. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons, tobacco smoke, and epigenetic remodeling in asthma. **Immunol Res**, v. 58, n. 2-3, p. 369-73, May 2014.

LIAMIN, M. et al. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes. **Biochem Pharmacol**, v. 137, p. 113-124, Aug 1 2017.

LIUZZI, V. C. et al. Different effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in artificial and in environmental mixtures on the free living nematode *C. elegans*. **J Appl Toxicol**, v. 32, n. 1, p. 45-50, Jan 2012.

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 243-248, 2002.

SARMA, S. N.; BLAIS, J. M.; CHAN, H. M. Neurotoxicity of alkylated polycyclic aromatic compounds in human neuroblastoma cells. **J Toxicol Environ Health A**, v. 80, n. 5, p. 285-300, 2017.

SESE, B. T.; GRANT, A.; REID, B. J. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Toxicol Environ Health A**, v. 72, n. 19, p. 1168-80, 2009.

SHEWEITA, S. A.; AL-SHORA, S.; HASSAN, M. Effects of benzo[a]pyrene as an environmental pollutant and two natural antioxidants on biomarkers of reproductive dysfunction in male rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, n. 17, p. 17226-35, Sep 2016.

TAEHOON, N. et al. **Determination of biomarkers for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*)**. 2015.

WATKINS, C. D. K. J. B.; KLAASSEN, C. D. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. McGraw Hill Brasil, 2012. 459 ISBN 9788580551327.

YU, H. Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, v. 20, n. 2, p. 149-83, Nov 2002.

ZASADOWSKI, A.; WYSOCKI, A. [Some toxicological aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) effects]. **Rocz Panstw Zakl Hig**, v. 53, n. 1, p. 33-45, 2002.