

A importância do uso de métodos complementares para a avaliação da toxicidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: the importance of the use of complementary methods

Patrícia I. Morgado, Luísa Jordão

maria.jordao@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) e seus derivados Halogenados (HHAPs) são conhecidos como um conjunto de contaminantes ambientais, classificados como potencialmente tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos, sendo um assunto de extrema importância e preocupação para a saúde pública. Diversos estudos têm reportado o potencial efeito tóxico destes compostos após longos períodos de exposição, pelo uso de métodos colorimétricos como o ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e vermelho neutro. Contudo, apesar de estes métodos clássicos de avaliação da citotoxicidade *in vitro* permitirem, de forma rápida, identificar as propriedades nocivas dos compostos, não permitem compreender os mecanismos moleculares subjacentes responsáveis pela sua toxicidade. Deste modo, no presente estudo, para avaliar os efeitos à exposição aos compostos Pireno (Pir) e seu derivado resultante da desinfecção de águas por bromação, 1-BromoPireno (1-BrPir), foram utilizados outros métodos complementares como avaliação do stress oxidativo e vários fenómenos associados à morte celular programada. Os resultados obtidos comprovam não só a existência de efeitos citotóxicos dos poluentes quando acumulados, como também possíveis efeitos genotóxicos. Assim, pelos métodos complementares, foi possível a identificação de alvos moleculares passíveis de ação farmacológica, o que pode constituir o primeiro passo para o desenho de estratégias terapêuticas que visem prevenir ou tratar os danos provocados por estes poluentes no Homem.

_Abstract

*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and their halogenated derivatives (HPAHs) are known as a set of environmental contaminants classified as potentially toxic, mutagenic and carcinogenic, being a matter of utmost importance and concern to public health. Several studies have reported the potential toxic effects of these compounds after long periods of exposure by the use of colorimetric methods such as 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and neutral red. Nonetheless, despite these classic *in vitro* cytotoxicity assays allow, in a faster way, the identification of the harmful properties of the compounds, they fail in elucidating the underlying molecular mechanisms responsible for their toxicity. Taking into account these mentioned aspects, in the present work, other complementary methods were used in order to evaluate the effects of the exposure to Pyrene (Pyr) and to a brominated-pyrene derivative (resulted from water disinfection), 1-BromoPyrene (1-BrPyr). Effectively, by the evaluation of the oxidative stress and programmed cell death induced by PAHs it was not only possible*

to verify the cytotoxic effects of PAHs when accumulated but also their potential genotoxic effects. In conclusion, through the use of other tests than the classic cytotoxicity assays, it was possible to identify potential druggable molecular targets which can be the first step towards the development of new therapeutic strategies either to prevent or treat the damage caused by these compounds in Humans.

_Introdução

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) são conhecidos como um conjunto de contaminantes ambientais, formados por dois ou mais anéis aromáticos condensados, sendo as suas principais fontes de emissão a queima espontânea de florestas, incêndios, emissões vulcânicas, combustão incompleta de matéria orgânica e, de uma forma mais próxima, através das emissões automóveis e fumo de tabaco (1).

HAPs estão amplamente distribuídos na atmosfera e foram dos primeiros poluentes classificados como potencialmente tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos, sendo um assunto de extrema importância e preocupação para a saúde pública (2). O facto de serem compostos altamente hidrofóbicos e lipofílicos facilita a sua absorção pelos pulmões, tubo digestivo e pele e posterior acumulação no tecido adiposo dos seres humanos. Uma vez na atmosfera podem ser transportados para longas distâncias antes de serem depositados, por precipitação, nos solos, vegetações e águas (1).

Apesar de ainda pouca explorada a contaminação de águas por HAPs, é de igual ou maior importância estudar a presença e efeitos nefastos dos HAPs neste tão indispensável recurso para todos os seres vivos na Natureza (3). Efetivamente, a presença destes compostos em cursos de água constitui um grave problema, uma vez que os processos convencionais de

tratamento de águas (como a coagulação ou filtração) não garantem a sua completa remoção. Acresce ainda o facto, reportado em alguns estudos científicos, da formação de derivados clorados ou bromados destes compostos, com o uso de hipoclorito de sódio ou brometo de potássio como agentes de desinfecção, respetivamente. Estes derivados halogenados, de um modo geral são mais tóxicos que os seus compostos parentais (4).

Tendo em consideração todos estes aspetos mencionados e a já demonstrada capacidade destes poluentes ambientais causarem graves problemas de saúde após longos períodos de exposição, no presente trabalho procurámos estudar e compreender os mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade dos HAPs pelo uso de métodos complementares aos clássicos ensaios de avaliação de citotoxicidade *in vitro*. Pireno (Pir) e o seu derivado halogenado resultante da desinfecção de águas por bromação, 1-BromoPireno (1-BrPir), foram utilizados como HAPs modelo, podendo estes métodos complementares serem adotados para o estudo de muitos outros HAPs presentes no ambiente.

_Objetivo

Contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade de HAPs e seus derivados através da identificação de possíveis alvos moleculares usando como modelo as células HePG2 de origem hepática (órgão de desintoxicação por excelência).

_Materiais e métodos

Poluentes orgânicos e linha celular: o poluente parental Pir e seu derivado halogenado 1-BrPir foram obtidos comercialmente. A linha celular de hepatocarcinoma humano HepG2 (ATCC HB-8065) foi cultivada em DMEM-F12 contendo L-Glutamax, tampão HEPES (25mM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI de penicilina e estreptomicina, a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Este meio de cultura, descrito anteriormente, foi designado como meio de crescimento. Um meio de composição idêntica à descrita, mas apenas suplementado com 2% de SFB foi designado como meio de trata-

mento e usado em todos os ensaios de avaliação da citotoxicidade dos compostos em estudo. A propagação celular foi realizada quando havia uma confluência de aproximadamente 80%, usando tripsina-EDTA (0.5%) para destacar as células.

Avaliação dos efeitos citotóxicos dos compostos orgânicos pelo ensaio de MTT e vermelho neutro (VN): inicialmente a citotoxicidade induzida pelos compostos foi avaliada através da determinação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT (viabilidade mitocondrial) e através do VN (viabilidade lisossomal) (4,5), após diferentes tempos de exposição das células a uma dose única ou a múltiplas doses dos compostos por reposição diária até um máximo de 6 µM. Este estudo foi assim efetuado de maneira a mimetizar a bioacumulação dos compostos após longos períodos de exposição, tal como acontece no organismo humano.

Acumulação intracelular dos compostos: a bioacumulação dos compostos nas células foi visualizada por microscopia confocal (Leica, SP2) após a exposição das células a diferentes concentrações dos poluentes até um máximo de 20 µM. As doses de composto foram repartidas por 3 vezes ao dia de modo a evitar a precipitação do poluente ambiental e permitir a sua internalização na célula. A marcação do citoesqueleto de actina foi efetuada com uma solução de faloidina marcada com Alexa 568 (6). As células não expostas aos HAPs foram usadas como controlo negativo.

Avaliação do stress oxidativo induzido pelos HAPs: a avaliação da produção de radicais de oxigénio das células tratadas com 2 µM de Pir e 1-BrPir foi indiretamente avaliada por um método espectrofotométrico que determina a atividade da catalase a 240nm (7).

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e área nuclear das células: a avaliação do potencial da membrana mitocondrial foi efectuada através de um ensaio com Mitotracker red, enquanto a avaliação da área nuclear das células foi efectuada usando Hoescht como corante (8). As células foram expostas a 2 µM de Pir e 1-BrPir por 24, 48 e 72h. Os efeitos da despolarização mitocondrial e da alteração do tamanho do núcleo das células foram avaliados por comparação com o

controlo negativo (células não tratadas) e controlo positivo com a exposição celular a 50 μM de carbonilcianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) durante 24h. As células foram observadas ao microscópio confocal (Leica, SP2). A área nuclear foi determinada usando um software de análise de imagem, ImageJ (Scion Corp., Frederick, MD).

Avaliação da morte celular por apoptose: a indução de apoptose foi estudada através de ensaios para a detecção de marcadores apoptóticos, nomeadamente Anexina-V (marcador de apoptose precoce) e de duas caspases efectoras (caspases 3 e 7), envolvidas na indução da morte celular por apoptose tardia (9). Em ambos os ensaios as células foram expostas a 2 μM dos compostos. As amostras foram observadas ao microscópio confocal. A incubação com 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de camptotecina durante 24h e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *K. pneumoniae* durante 24h e 3 mM de ATP durante 30 minutos foi utilizada como controlo positivo para os ensaios de marcação com Anexina-V e caspase 3/7, respetivamente. Para ambos os ensaios, as células não expostas aos poluentes orgânicos foram utilizadas como controlo negativo.

Fragmentação do ADN: a morte por apoptose nas células tratadas com os compostos foi ainda avaliada através do perfil de mobilidade electroforética do ADN (10). Após a exposição das células a 2 μM de Pir e 1-BrPir por 24h, o ADN genómico foi extraído com QiAmp DNA Kit e uma electroforese em gel de agarose (1,5%) com *syber safe* foi efectuada. A revelação foi efectuada por exposição à luz ultravioleta num transiluminador tendo as imagens sido adquiridas através do *software* Geldoc.

Resultados e discussão

A importância do uso de métodos complementares para avaliar a toxicidade de HAPs

Inicialmente, e como métodos simples e rápidos de avaliação da citotoxicidade dos poluentes ambientais, a viabilidade mitocondrial e lisossomal das células expostas aos compostos foi avaliada pelos ensaios clássicos de MTT e VN, respetivamente. Foi observada uma diminuição da viabilidade celular com a bioacumulação dos poluentes. Efetivamente, as células

tratadas com 6 μM de 1-BrPir (doses de 2 μM repostas diariamente), apresentaram uma viabilidade mitocondrial inferior a 60%. Adicionalmente, o 1-BrPir demonstrou ser mais tóxico que o respetivo composto parental (Pir), indo ao encontro do que tem vindo a ser descrito (figura 1A). Contudo, o teste de VN demonstrou que após 48h de exposição a 2 μM de Pir e do seu derivado bromado a toxicidade do composto parental é superior (dados não apresentados).

Contudo, e como já dito anteriormente, estes ensaios permitem identificar o efeito citotóxico mas não o mecanismo pelo qual o mesmo é induzido. Podem, assim, induzir em erro o investigador que, perante os resultados aparentemente contraditórios, pode minimizar a toxicidade de um composto ou outro qualquer material em estudo. Tendo estes aspetos em consideração, no presente trabalho, foi decidido realizar outros métodos complementares que ajudassem a perceber como é que estes compostos afetam a célula e, consequentemente, o organismo humano.

Visualização da acumulação intracelular dos compostos

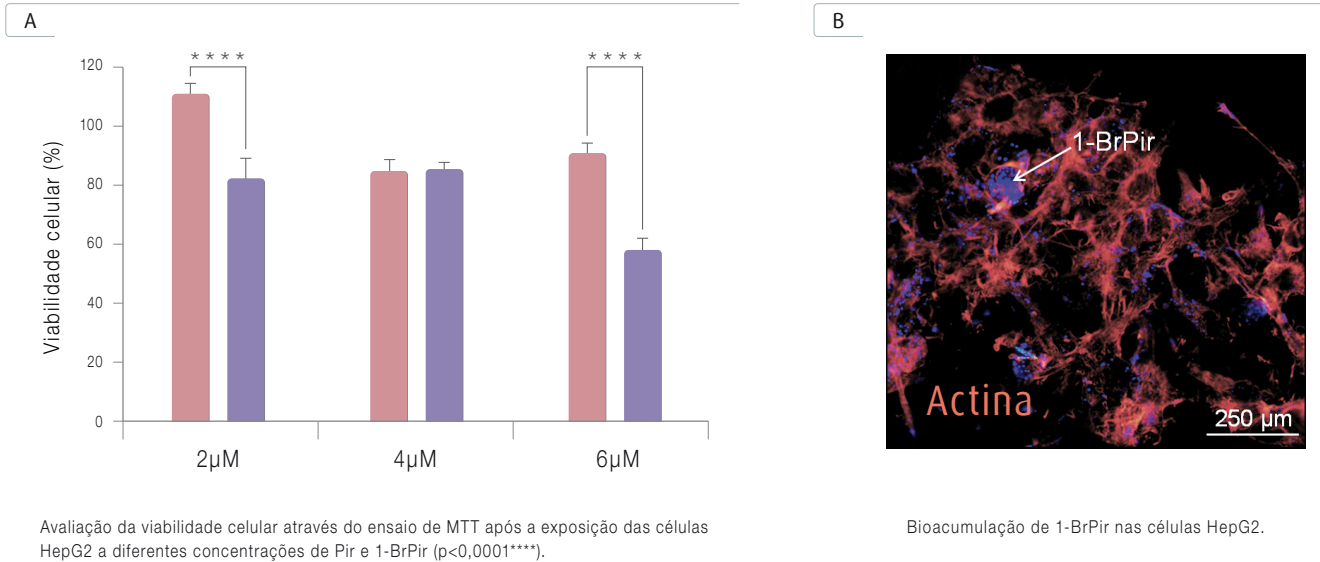
Uma das características particulares destes compostos é a sua fluorescência intrínseca. Esta característica permitiu monitorizar a acumulação/localização intracelular dos compostos validando os resultados dos testes de viabilidade celular.

Por microscopia confocal verificou-se, um aumento da fluorescência proporcional à concentração de composto. Como exemplo, na figura 1B é possível visualizar o HAP 1-BrPir numa concentração de 20 μM internalizado na célula (pontos azuis). Estes resultados vieram uma vez mais confirmar a bioacumulação dos compostos nas células e a sua fácil difusão através da membrana celular devido ao seu carácter lipofílico. A quantificação da concentração intracelular dos compostos é a sequência lógica deste estudo.

Avaliação da produção de radicais de oxigénio

Está descrito que, durante o processo metabólico, os HAPs produzem Espécies Reativas de Oxigénio (ROS) via citocromo P450. Posteriormente, estes ROS e metabolitos podem causar danos oxidativos no ADN e formar fragmentos, iniciando a cadeia mutagénica responsável pelo início de um tumor (10).

Figura 1A-B: ⬇ Citotoxicidade dos HAPs e sua bioacumulação.



A avaliação de produção de ROS foi, neste estudo, indiretamente avaliada pela atividade da catalase, uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em oxigénio e água. Assim, a degradação de H₂O₂ foi usada para quantificar a atividade da catalase das células expostas aos compostos (tabela 1). Após 24h de exposição à concentração

mais baixa de compostos (2 µM) foi observado um aumento da atividade da catalase em comparação com as células não tratadas (C.N.). Este resultado demonstra a capacidade dos HAPs em estudo interagirem com o citocromo P450 levando a uma maior produção de ROS e possivelmente apresentando algum efeito mutagénico e genotóxico.

Tabela 1: ⬇ Avaliação da produção de radicais de oxigénio, despolarização mitocondrial, células positivas para as caspases 3/7, área e fragmentação nuclear das células HePG2.

Compostos	Citoplasma							Núcleo			
	Catalase 24h	Despolarização Mitocondrial			Caspases 3/7			Área 24h	Área 48h	Área 72h	Fragmentação 24h
		24h	48h	72h	24h	48h	72h				
Pir	+	+	+	+	++	++	+++	++	++	+	+
1-BrPir	++	-	(+/-)	(+/-)	+	+++	+++++	++	+	-	++
C.N.	-	+	+	+	-	-	-	++++	+++	+++	-
C.P.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+++	+++	+++	-	-	-	++

Todos os resultados estão apresentados de uma forma qualitativa.

C.N. controlo negativo, C.P. controlo positivo, n.a. não aplicável, - linha de base.

Para a atividade da catalase (valor correspondente a 100%), células positivas para as caspases 3/7 (sem células positivas) e fragmentação do ADN (sem fragmentação), o C.N. foi considerado como linha de base. Na determinação da área nuclear, o C.P. foi considerado como linha de base (menor área nuclear).

Despolarização mitocondrial: + mitocôndria polarizada, - mitocôndria despolarizada, (+/-) células com as mitocôndrias polarizadas e despolarizadas. Nos restantes estudos, quanto maior o número de símbolos +, mais intenso é o fenómeno pesquisado.

Avaliação de mecanismos de morte celular programada envolvidos na toxicidade dos HAPs

A morte celular programada também denominada por apoptose consiste numa cascata de eventos bem definidos a nível celular. Entre estes encontram-se alterações morfológicas e biológicas a nível celular, tais como a alteração da composição lipídica da membrana, alteração do potencial da membrana mitocondrial, ativação de caspases e fragmentação do ADN com a formação de corpos apoptóticos. Neste trabalho foram conduzidos estudos preliminares que visaram detetar algumas destas alterações despoletadas pela exposição aos HAPs.

Anexina-V

De modo a verificar se os poluentes orgânicos inibem a proliferação celular por morte celular programada (apoptose), foi inicialmente quantificada a presença do mediador precoce de apoptose, Anexina-V, pela incubação das células expostas aos HAPs ao mesmo marcador. A Anexina-V tem vindo a ser usada como um marcador não quantitativo que se liga à fosfatidilserina para identificar células apoptóticas. Em células saudáveis, a fosfatidilserina encontra-se no lado citosólico da membrana plasmática da célula. Após o início da apoptose, ela perde a sua distribuição assimétrica e desloca-se para a membrana extracelular, ligando-se, deste modo, à Anexina-V.

Contudo, após 12 e 24h de exposição das células aos compostos não se verificou a presença de Anexina-V, pelo que podemos concluir que as células poderão sofrer uma apoptose mais tardia ou mediada por vias de sinalização independentes da Anexina-V.

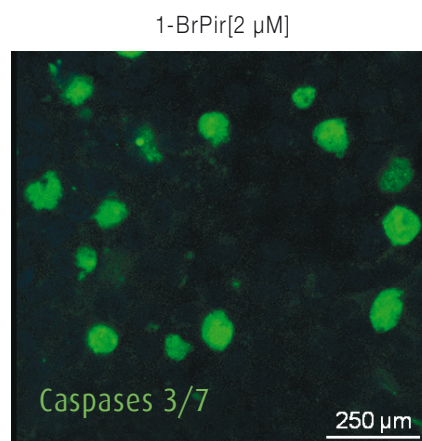
Despolarização da membrana mitocondrial

Ao mesmo tempo, foi avaliado o potencial de membrana mitocondrial através de um ensaio com Mitotraker red. As células foram tratadas com os diferentes compostos nas doses mais baixas, numa escala temporal de 24, 48 e 72h. Foi efectuada uma avaliação qualitativa após a visualização das células por microscopia confocal. Como é possível observar na [tabela 1](#), não foi verificada uma despolarização mitocondrial significativa ao longo do tempo. Contudo, na maior parte dos casos a verificação de uma maior despolarização mitocondrial é coincidente com uma maior citotoxicidade do composto.

Caspases 3/7

Após não se ter verificado uma apoptose precoce das células utilizando a Anexina-V, resolvemos estudar outros mediadores de apoptose (mais tardia), nomeadamente as caspases 3 e 7, ditas como efetoras. As células foram tratadas com 2 μM de HAPs e foi observado, através de microscopia confocal, um aumento de células positivas para as caspases 3 e 7, após 72h de exposição. Tal aumento foi mais significativo para 1-BrPir ([tabela 1](#), [figura 2](#)). Uma vez que a Anexina-V não foi detectada, a apoptose induzida pelos compostos estudados nas células HepG2 é mediada pela ativação da cascata apoptótica das caspases 3/7.

Figura 2: Avaliação da morte celular por apoptose via caspase 3/7.



A ativação das caspases 3 e 7 foi pesquisada após 24, 48 e 72h de exposição a 2 μM de 1-BrPir.

A imagem é representativa do efeito observado após 72h de exposição, na qual são visíveis células positivas para a presença da forma ativa das caspases 3/7 (verde).

Alterações do núcleo celular

A área dos núcleos das células expostas aos HAPs foi determinada ao longo do tempo, por um período de 72h. Como resumido na [tabela 1](#), a área dos núcleos das células diminui ao longo do tempo. Efetivamente, após 72h de exposição das células aos compostos a área dos núcleos das células tratadas com Pir (sem diferença estatisticamente significativa) e 1-BrPir ($p < 0,05$), aproximou-se da área nuclear das células do controlo positivo. Está descrito que a diminuição da área do núcleo é

uma evidência de morte celular programada, isto é, por apoptose, e tal como visto no ensaio das caspases 3/7 o composto 1-BrPir parece ser aquele com maior ativação das caspases e, conseqüentemente, o que promove uma diminuição maior no tamanho dos núcleos das células.

Por fim, a morte por apoptose das células tratadas com os compostos após 24h, foi avaliada pela demonstração eletroforética da fragmentação do ADN. Os HAPs estudados provocaram a fragmentação do ADN genómico das células, apresentando bandas com pesos moleculares e intensidades semelhantes ao controlo positivo (C.P.). No controlo negativo (células não tratadas) tal fragmentação não se verificou (tabela 1). Este resultado indica que os compostos provocam uma morte celular programada por lesões no material genético das células, evidenciando, uma vez mais, o possível efeito genotóxico dos compostos em estudo.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que os métodos clássicos de avaliação da citotoxicidade não permitem identificar alterações a nível de determinados compartimentos celulares que podem vir a desencadear efeitos nocivos para o ser humano. Na concentração testada mais baixa (2 µM) nenhum dos compostos revelou ser citotóxico pelos métodos clássicos contudo os métodos complementares revelaram a existência de alterações significativas ao nível do ADN. Este resultado alerta para o possível efeito genotóxico dos compostos que podem ser potencialmente mutagénicos ou cancerígenos.

Em suma, os resultados apresentados neste trabalho mostram a necessidade de utilizar outros métodos para além dos ensaios clássicos de avaliação de citotoxicidade de modo a compreender os mecanismos moleculares subjacentes responsáveis pela toxicidade dos HAPs para os seres humanos.

Financiamento:

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto RECI/QEQ-MED/0330/2012, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

Referências bibliográficas:

- (1) Kim KH, Jahan SA, Kabir E, et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int.* 2013;60:71-80.
- (2) Sun JL, Jing X, Chang WJ, et al. Cumulative health risk assessment of halogenated and parent polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particulate matters in urban air. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;113:31-7. Epub 2014 Dec 5.
- (3) Martinez E, Gros M, Lacorte S, et al. Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *J Chromatogr A.* 2004;1047(2):181-8.
- (4) Pinto M, Rebola M, Louro H, et al. Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Drinking Water Disinfection: Synthesis, Formation under Aqueous Chlorination Conditions and Genotoxic Effects. *Polycyclic Aromat. Compd.* 2014; 34(4): 356-71.
- (5) Deng WJ, Louie PKK, Liu WK, et al. Atmospheric levels and cytotoxicity of PAHs and heavy metals in TSP and PM2.5 at an electronic waste recycling site in southeast China. *Atmos. Environ.* 2006;40:6945-55.
- (6) Bialkowska K, Byzova TV, Plow EF. Site-specific phosphorylation of kindlin-3 protein regulates its capacity to control cellular responses mediated by integrin α IIb β 3. *J Biol Chem.* 2015;290(10):6226-42. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358261/
- (7) Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- (8) Wilson J, Berntsen HF, Zimmer KE, et al. Effects of defined mixtures of persistent organic pollutants (POPs) on multiple cellular responses in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2, using high content analysis screening. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;294:21-31.
- (9) Shen W, Guan Y, Wang J, et al. A polysaccharide from pumpkin induces apoptosis of HepG2 cells by activation of mitochondrial pathway. *Tumour Biol.* 2016;37(4):5239-45. Epub 2015 Nov 10.
- (10) Park SY, Lee SM, Ye SK, et al. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicol Lett.* 2006;167(1):27-33.