

## Resumo MPU 2009 Cássia Rodrigues

### EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA DE REPARO DE DNA EM HEPATÓCITOS DE *Danio rerio* (CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) EXPOSTOS A UM PESTICIDA ORGANOFOSFORADO (METIL PARATION)

SILVEIRA, C.R.; MARINS, L.F.; SANDRINI, J.Z.; TRINDADE, G.S.; NORBERG, B.S.

#### Introdução

Os pesticidas utilizados na agricultura com o objetivo de aumentar a produção de alimentos pela erradicação de insetos e vetores de doenças têm desencadeado uma série de efeitos danosos ao meio ambiente e com conseqüências graves à saúde pública.

No presente estudo, utilizamos o pesticida organofosforado, cujo um efeito já estabelecido é sua capacidade de gerar estresse oxidativo em ratos e humanos. Esta situação é caracterizada por um desbalanço entre a produção de espécies ativas de oxigênio (EAO) em um organismo e suas defesas antioxidantes, em favor da primeira, culminando com a oxidação de biomoléculas celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios.

As células desenvolveram um sistema de reparo do DNA a fim de proteger o genoma de danos como as lesões geradas pelo estresse oxidativo.

#### Objetivo

Analisar a expressão de genes relacionados ao sistema de reparo de DNA e apoptose em hepatócitos de *Danio rerio*, após exposição a diferentes concentrações do pesticida organofosforado metil-paration.

#### Metodologia

Para testar a viabilidade celular foi utilizado o método de exclusão por azul de tripan. As células foram mantidas em uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço com 200 $\mu$ L meio RPMI suplementado com SFB e com  $\beta$ -mercaptoetanol.

Para a determinação das doses subletais do metil paration (MP) foram analisadas 5 concentrações: 0,0035 mg.L<sup>-1</sup>; 0,035 mg.L<sup>-1</sup>; 0,35 mg.L<sup>-1</sup>; 3,5 mg.L<sup>-1</sup> e de 35 mg.L<sup>-1</sup>, em 24 horas de exposição.

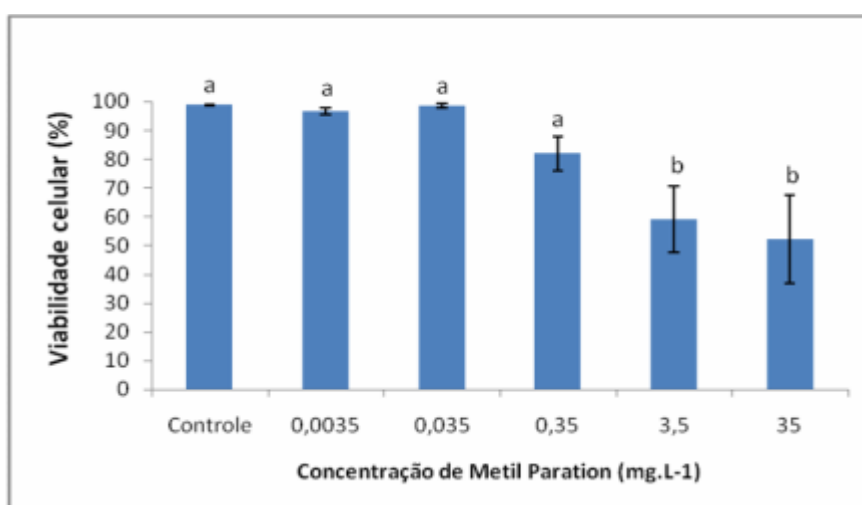
Os testes de expressão dos genes envolvidos na resposta à exposição ao MP foram realizados através da técnica da RT-PCR semiquantitativa, após 24 horas de exposição. Para isso, foram utilizados *primers* específicos para os seguintes genes: P53, P21, BAX e BCL-2.

Os produtos das reações de PCR foram corridos em géis de agarose 1% e fotografados. As fotos foram analisadas através do software *1DScan*.

Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste-*t* para amostras independentes.

## Resultados e Discussão

As concentrações de 0,0035; 0,035 e 0,35 mg.L<sup>-1</sup> não causaram mortalidade significativa. Porém, as concentrações de 3,5 mg.L<sup>-1</sup> e de 35 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram uma redução significativa na viabilidade dos hepatócitos expostos por 24 horas ao MP ( $p < 0,05$ ).

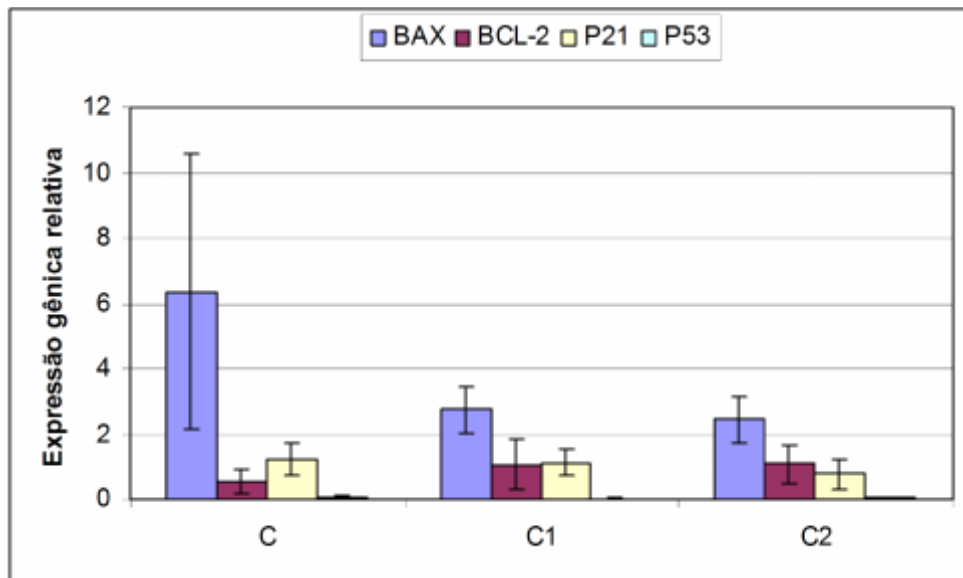


**Figura 1** - Viabilidade celular de hepatócitos de zebrafish (*Danio rerio*) expostos a diferentes concentrações de metil paration. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre o tratamento e o controle ( $p < 0,05$ ). Dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

Com base nos resultados da viabilidade celular foram estipuladas as concentrações de MP de 0,035 (C1) e 0,35 mg.L<sup>-1</sup> (C2) para os experimentos de expressão gênica, uma vez que estas concentrações não afetaram a viabilidade das células.

Para o gene p53 foi observada uma manutenção dos níveis de expressão em ambos os tratamentos. Corroborando com este resultado o gene P21, um alvo direto da atividade transcricional da proteína P53, também não teve sua expressão afetada pela exposição ao pesticida.

Da mesma forma que o observado para P53 e P21, os genes relacionados com a apoptose (BAX e BCL-2) também não demonstraram variação estatisticamente significativa em função da exposição ao pesticida. Entretanto, BAX mostrou uma forte tendência a diminuir em função do aumento da concentração do MP, enquanto que BCL-2 teve uma tendência oposta, aumentando sua expressão com o aumento da concentração do MP (Figura 2).



**Figura 2** - Expressão dos genes P53, p21, BAX e Bcl2 em hepatócitos de zebrafish (*Danio rerio*) expostos a diferentes concentrações de metil paration: C1 = 0,035 mg.L<sup>-1</sup>; C2 = 0,35 mg.L<sup>-1</sup>. Dados estão expressos em média ± erro padrão da razão da expressão do gene alvo pela expressão do gene normalizador (EF1a).

## Conclusão

As tendências observadas na expressão dos genes analisados podem indicar que a regulação destes genes pode se tornar mais evidentes em experimentos de exposição mais prolongados ou utilizando um método mais sensível, como a análise de expressão gênica em PCR tempo real.

## Referências

- Abdollahi R. P., Mostafalou S., Pournourmohammadi S., Shadnia S., 2004 Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion *Comparative Biochemistry and Physiology C* 137: 29-34.
- Hoeijmakers J. H. J., 2001 Genome maintenance mechanisms for preventing cancer *Nature* 411: 366-374.
- Zar J. H., 1984 *Biostatistical analysis*. Ed. Prentice Hall, 2da ed., New Jersey. 718 pp.