

Mecanismos de acumulação de cobre em células branquiais isoladas do marisco *Mesodesmas mactroides*

Oliveira, C.B.¹; Nogueira, L.S.²; Bianchini, A.³

¹ Acadêmica do Curso de Oceanologia - FURG; ² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - FURG; ³ Instituto de Ciências Biológicas – FURG.

Introdução

O cobre é considerado um micronutriente essencial, participando de uma série de funções fisiológicas nos organismos aquáticos. Por outro lado, quando presente em altas concentrações na água, este metal pode ser tóxico. Os moluscos marinhos são animais osmoconformadores e considerados excelentes bioindicadores de acumulação de metais. Dados sobre a acumulação do cobre em moluscos sob exposição aguda ao metal indicam que este contaminante é preferencialmente acumulado nas brânquias, seguido por uma acumulação na glândula digestiva (Roméo & Gnassia-Barelli, 1995).

Com base no acima exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar a cinética de acumulação do cobre em células branquiais isoladas do marisco branco *Mesodesma mactroides*, bem como o envolvimento de mecanismos de transporte iônico e enzimas associadas na acumulação celular de cobre, através de espectrometria de absorção atômica (EAA) associada ao uso de ferramentas farmacológicas.

Metodologia

Exemplares de *M. mactroides* foram coletados na Praia do Mar Grosso (São José do Norte, RS) e aclimatados às condições de laboratório (20°C, salinidade 30 e fotoperíodo 12C:12E). Após aclimatação, as células branquiais foram isoladas utilizando-se a metodologia descrita por Kelly *et al.* (2000), com modificações. Foram utilizadas preparações celulares com no mínimo 80% de viabilidade, determinada pelo método de exclusão de azul de Tripán.

Primeiramente, as células foram expostas (3 h) a concentrações de 0,5; 1,0 e 2,5 µM de cobre. Após obtenção da cinética de acumulação do metal em função da concentração de cobre, as células foram expostas (3 h) a 1 µM do metal, visando avaliar os possíveis mecanismos de transporte envolvidos nesta acumulação. Os mecanismos avaliados foram os trocadores Na⁺/H⁺ e Cl⁻/HCO₃⁻ e a atividade da anidrase carbônica. Os bloqueadores específicos utilizados foram a etil-isopropil-amilorida (EIPA – 0,02 µM), o 4-acetamido-4-isotiocianato-2,2-estibeno ácido disulfônico (SITS – 500 µM) e acetazolamida (1 mM), respectivamente.

Após exposição ao cobre e aos fármacos, as células foram lavadas com solução de EDTA, a fim de eliminar o metal adsorvido na membrana. Após digestão ácida (HNO₃ Suprapur - Merck) e adequada diluição, o cobre acumulado foi determinado por EAA. Os valores médios de cobre nas células dos mariscos do grupo controle (não expostos ao cobre) foram reduzidos daqueles observados nas células dos mariscos expostos ao cobre. Assim, os

dados de acumulação de cobre foram expressos considerando-se apenas a quantidade de cobre “novo” acumulado nas células branquiais.

Resultados e Discussão

Durante o período (3 h) de determinação da cinética de acumulação do cobre, as células branquiais apresentaram uma viabilidade celular constante (81-83%). Por sua vez, a capacidade máxima de acumulação celular de cobre ($V_{m\acute{a}x}$) foi de $6,13 \pm 0,28$ ng Cu/ 10^5 células (Fig. 1).

Durante as análises dos mecanismos envolvidos na acumulação de cobre, o valor médio do cobre “novo” acumulado foi de $11,0 \pm 1,9$ ng Cu/ 10^5 , exceto após bloqueio do trocador Na^+/H^+ pelo EIPA. Neste caso, foi observada uma morte massiva das células branquiais, não sendo possível, portanto, avaliar a acumulação do metal nesta condição experimental. Por outro lado, foi observada uma redução completa ($109,9 \pm 22,5\%$) na acumulação celular do cobre “novo” após inibição da anidrase carbônica pela acetazolamida (Fig. 2).

A acumulação do cobre em células branquiais seguiu uma cinética do tipo saturação, isto é, mediada por transportadores, em baixas concentrações do metal. Quanto à morte massiva das células após o bloqueio do trocador Na^+/H^+ com EIPA, esta deve estar relacionada ao fato de que este transportador está diretamente envolvido na regulação do pH intracelular (Alberts *et al.*, 1997). Por sua vez, a inibição completa da acumulação de cobre após o bloqueio da anidrase carbônica com acetazolamida indica que o trocador Na^+/H^+ pode ser uma importante via de entrada deste metal nas células branquiais de *M. mactroides*, através da competição do íon Cu^+ com íon Na^+ .

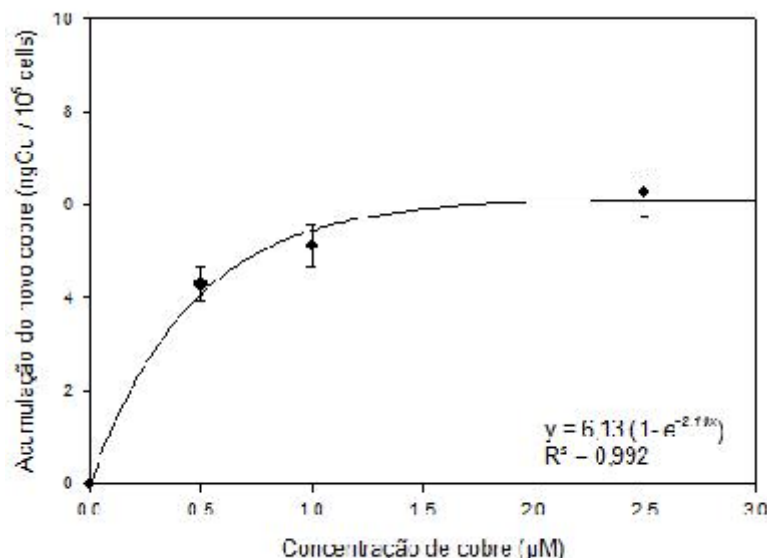


Figura 1. Acumulação de cobre “novo” em células branquiais do marisco *Mesodesma mactroides* em função da concentração de cobre no meio experimental.

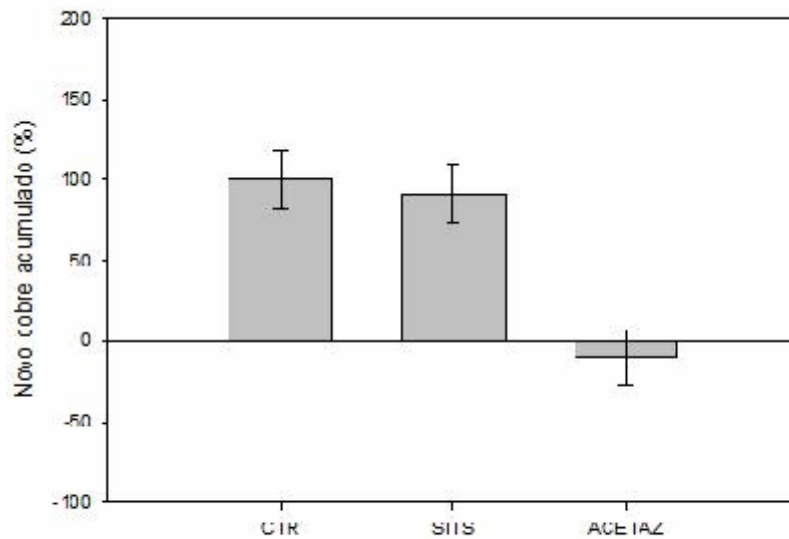


Figura 2. Percentagem do cobre "novo" acumulado em células branquiais do marisco *Mesodlesma mactroides* após exposição a 1 μ M na presença de diferentes fármacos. * indica média significativamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Referências

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. 1997. Tradução de Amauri Braga Simonetti... [et al.]. *Biologia Molecular da Célula*. Terceira Edição. Porto Alegre: Artes Médicas.

Kelly, S.P.; Fletcher, M.; Pärt, P.; Wood, C.M. 2000. Procedures for the preparation and culture of 'reconstructed' rainbow trout branchial epithelia. *Meth. Cell Sci.* 22: 153-163.

Roméo, M.; Gnassia-Barelli, M. 1995. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussates* treated with cadmium, copper or zinc. *Comp. Biochem. Physiol.* 111C: 457-463.