

CITOTOXICIDADE "IN VITRO" DE CLOROFENOXIACETATO COM CÉLULAS HEPÁTICAS DE *Metynnis roosevelti* (PISCES, CHARACIDAE) EM CULTIVO

LÍGIA MARIA SALVO; ROSÁRIA REGINA TESONI DE BARROS RICHARTZ;
MARA ELIZA GAZINO JOINEAU; MARIA IVETTE CARBONI MALUCELLI; METRY BACILA

Laboratório de Piscicultura, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná (FPR) Rua Dos Funcionários 1540 – CEP 800.35.050 Paraná-Brasil.

ABSTRACT – “In vitro” cytotoxicity of 2,4-D + MCPA (2,4-dichlorophenoxyacetic acid + 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid) tests were carried out with primary cultures of hepatic cells from *Metynnis roosevelti* (Pisces, Teleostei, Characidae). To establish the CL₅₀ values, two different methods were used: the measurement of cell viability by means of “neutral red” and by the direct microscopic observation of the defective cells by means of an IM inverted microscope. The average CL₅₀ value of the hepatic cells in primary cultures exposed to the chlorophenoxyacetates used, has been established between 0.0265 and 0.0312 g/ml.

RESUMO - Células hepáticas de *Metynnis roosevelti* obtidas de cultivo celular primário foram submetidas a ensaios de citotoxicidade “in vitro” com os princípios ativos 2,4-D+MCPA (ácido 2,4 diclorofenoxiacético+ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético). Para determinação da CL₅₀ foram utilizados dois métodos: um por meio da viabilidade celular com “vermelho neutro” e outro através da observação direta das células afetadas com microscópio invertido IM. A CL₅₀ média das células hepáticas de *Metynnis roosevelti* em cultivo primário expostas ao 2,4D+MCPA por 24 horas, foi estabelecida entre 0,0265 g/ml e 0,0312 g/ml.

Introdução

Estudos de citotoxicidade *in vitro* utilizando culturas de células de peixes, tem sido desenvolvidos para diferentes aplicações (BOLS *et al.*, 1985), inclusive para identificar os efeitos de agressores químicos que causam impacto no meio ambiente (CASTAÑO *et al.*, 1995; CHENG *et al.*, 1993; BABICH *et al.*, 1987; KOCAN *et al.*, 1985).

Em 1968, PILCHER *et al.* apud WOLF e QUIMBY (1969), realizaram os primeiros estudos comparando o crescimento com a atividade glicolítica de células de salmônídeos em cultivo. Se bem que tenha sido um trabalho preliminar, conseguiram esses autores detectar diferenças na atividade glicolítica de células em cultivo de peixes em comparação com a de outras espécies animais. As células em cultivo de peixe, mantém seu nível normal de atividade enzimática melhor do que as de mamíferos. Em consequência, possibilitam a determinação da toxicidade de substâncias químicas, com maior sensibilidade, rapidez e menores custos (AHNE, 1985; SEGNER *et al.*, 1994).

Testes de toxicidade com animais são freqüentemente utilizados na investigação dos efeitos da contaminação do meio ambiente. Alguns testes são limitados pelo número de animais que podem ser econômica e convenientemente estudados, por problemas em obter animais de linhagens puras e em perfeito estado fisiológico, e dificuldade de extrapolar resultados de uma espécie para outra. Um meio encontrado para superar essas dificuldades foi a utilização do cultivo de células que permite a análise de uma grande quantidade de

amostras e determina com maior especificidade a atividade do agente tóxico nas células de um único organismo (KOCAN *et al.*, 1984; SAITO e SHIGEOKA, 1994).

A sensibilidade aguda dos animais a diferentes compostos tóxicos varia muito de espécie para espécie e mesmo quando uma espécie adequada é escolhida como bioindicadora, suas respostas agudas ou crônicas a diferentes compostos tóxicos variam de acordo com outros fatores, como a resistência individual, a predisposição genética do organismo, além das condições físico-químicas do ambiente e da ocorrência ou não de relacionamentos sinérgicos entre os compostos químicos no local (HAWKINS, 1987; HAKANSSON *et al.*, 1991). Consequentemente, a utilização apropriada de células isoladas em meio de cultivo, possibilita separar as várias alterações físicas e químicas que interagem com os organismos prejudicando as reações. Por meio disso, permite o estudo de ações específicas no interior das células sem a interferência dos efeitos de outros sistemas (DIPPLE e BIGGER, 1983).

Na década de sessenta, os pesquisadores já utilizavam testes de citotoxicidade *in vitro* com células em cultivo de peixes para detectar os efeitos causados por agentes tóxicos em organismos aquáticos. Em 1965, PICKERING e VIGOR apud RACHLIN e PERLMUTER, 1968, determinaram a toxicidade de metais pesados na embriogênese de salmônídeos; RACHLIN e PERLMUTER, 1968, verificaram redução na replicação celular de uma cultura de células de peixes da família dos salmônídeos, expostas ao zinco por 96 horas.

Recentemente, com o aumento na utilização de

agentes tóxicos de ordem natural ou antropogênica e conseqüente degradação ambiental (KOCAN *et al.*, 1984), são inúmeros os trabalhos realizados que utilizam células de peixes em cultivo como instrumento de estudo para avaliação da contaminação do ambiente aquático (PARKINSON e AGIUS, 1988; BABICH e BORENFREUND 1987a; SAITO *et al.*, 1991).

O presente trabalho (SALVO, 1997) teve como objetivo, realizar testes de citotoxicidade “in vitro” com células hepáticas de *Metynnis roosevelti* em cultivo primário, utilizando os princípios ativos 2,4-D+MCPA, nas seguintes concentrações: 0,0275 g/ml; 0,00275 g/ml e 0,000275 g/ml. A concentração letal média do herbicida, ficou em torno de 0,0275 g/ml, para as células hepáticas de *Metynnis roosevelti* em cultivo primário.

Metodologia

Com a obtenção das células hepáticas em monocamada de *Metynnis roosevelti*, semeadas em microplacas de poliestireno Falcon na densidade de 3×10^4 células por ml com meio F10-199 modificado pela adição de L-glutamina 2mM (FLOURIOT *et al.*, 1993; CHENG *et al.*, 1993; KOCAL *et al.*, 1987), insulina 10 µg/ml (HAYASHI e OOSHIRO, 1986; HIGHTOWER e RENFRO, 1988; WATANABE *et al.*, 1986; LIPSKY *et al.*, 1986) e 50µg/ml de fibronectina (Gibco BRL, Bovine Plasma Fibronectin) (CHENG

et al., 1993; HIRATA, *et al.*, 1993) foram realizados os testes de citotoxicidade *in vitro* de acordo com a metodologia de BABICH e BORENFREUND, (1987 a.,b,c,d,e,f). Células hepáticas de peixes da família Characidae foram incubadas em câmara de CO₂ a 5% e temperatura constante de 30^o C por 24 horas. Posteriormente, o meio foi trocado e as células, por um período de 24 horas, colocadas em contato com o agente a ser testado (2,4-D+MCPA) em várias diluições (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) para determinação do CL₅₀; (Tabela I). Após esse período, o meio com o agente a ser testado foi removido e substituído pelo meio F10-199 contendo 50 µg/ml de “vermelho neutro”. As microplacas, foram então incubadas por 3 horas para permitir que o corante lisossomas das células viáveis, que não foram prejudicadas pelo agente a ser testado, no caso o herbicida diclorofenoxiacético (2,4-D+MCPA). Posteriormente, o meio com “vermelho neutro” foi removido, e as células rapidamente enxaguadas com fixador (formaldeído 4% e CaCl₂ 1%) adicionando-se, então, a cada poço 0,2 ml da mistura de ácido acético 1% com etanol 50% para a extração do corante. Após 20 minutos à temperatura ambiente e uma rápida agitação, a placa foi transferida para o espectrofotômetro ATC 340 Labtene com filtro de 540 nm para medir a absorbância. Após a adição de “vermelho neutro”, a população celular submetida ao estresse pelo agente a ser testado, foi observada em microscópio invertido IM.

Tabela 1. Número total de semeaduras nas microplacas.

Diluições do 2,4-D+MCPA em g/ml						
Controle	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
480	288	288	288	288	288	288

ÍNDICE DE TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D+MCPA

Para determinação da diluição do herbicida diclorofenoxiacético, e o estudo de seu efeito tóxico (CL₅₀), foi utilizada a fórmula de Spearman Karber (BERQUÓ *et al.*, 1981):

$$\Sigma T_{50} = t^* + \Delta t, \text{ onde}$$

t* = maior diluição do herbicida diclorofenoxiacético que causou efeito tóxico em oito (100%) dos pocinhos da microplaca; Δt = número de pocinhos afetados (onde a monocamada celular foi parcial ou totalmente destruída), em t* e em diluições maiores dividido por oito menos 4/8 (50%);

$$\Delta t = (8+0)/8 - 4/8 = 4/8$$

$$\Delta t = 0,5$$

$$\Sigma T_{50} = t^* + \Delta t$$

$$\Sigma T_{50} = 10^{-1,5}$$

Calculando-se o anti-logaritmo, têm-se a diluição do herbicida que quando utilizada causará efeito tóxico em 50% dos pocinhos.

Resultados e Discussão

ÍNDICE DE TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D+MCPA. Com o herbicida 2,4-D+MCPA, adicionado às células hepáticas em cultivo nas diferentes concentrações, após 24 horas foi feita a contagem dos pocinhos afetados (Tabela 1) através do microscópio invertido IM. Esses resultados estão expressos nos cálculos abaixo:

Cálculo da Diluição do Herbicida diclorofenoxiacético (2,4-D+MCPA)

Determinação da CL₅₀:

$$\Sigma T_{50} = t^* + \Delta t$$

$$t^* = 1.0$$

Citotoxicidade de Clorofenoxiacetato em Célula em Cultivo

$$\Delta t = (6+0)/6 - 3/6 = 3/6$$

$$\Delta t = 0,5$$

$$\Sigma T_{50} = t^* + \Delta t$$

$$\Sigma T_{50} = 10^{-1,5}$$

$$\text{anti-log } 1,5 = 1:31,62$$

Índice de Toxicidade do 2,4 - D + MCPA
50%

$$\text{IT } 50\% = 0,03162 \text{ g/ml}$$

Tabela 2. Valores de absorvância (nm) obtidos em teste de citotoxicidade *in vitro* de células hepáticas de *M. roosevelti* em cultivo expostas a diferentes concentrações do herbicida 2,4 D+MCPA.

Controle	Concentrações do 2,4 D + MCPA			
	0,0275 g/ml	0,00275g/ml	0,000275g/ml	
0,782	0,374	0,442	0,584	
0,748	0,371	0,444	0,509	
0,783	0,381	0,427	0,557	
0,664	0,382	0,493	0,534	
0,729	0,321	0,464	0,533	
0,679	0,373	0,462	0,509	
0,604	0,364	0,497	0,553	
0,721	0,388	0,409	0,591	
0,685	0,337	0,476	0,594	
0,674	0,364	0,423	0,517	
0,784	0,382	0,427	0,541	
0,631	0,396	0,487	0,584	
Média	0,707	0,36941667	0,45425	0,5755

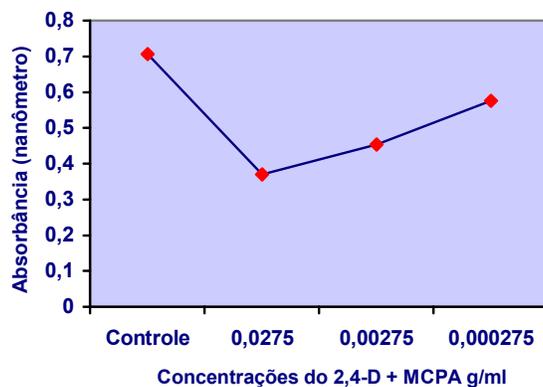


Fig. 1. Representação gráfica dos valores médios de absorvância obtidas em teste de citotoxicidade *in vitro* de células hepáticas de *M. roosevelti* em cultivo expostas a diferentes concentrações do herbicida 2,4 - D+MCPA.

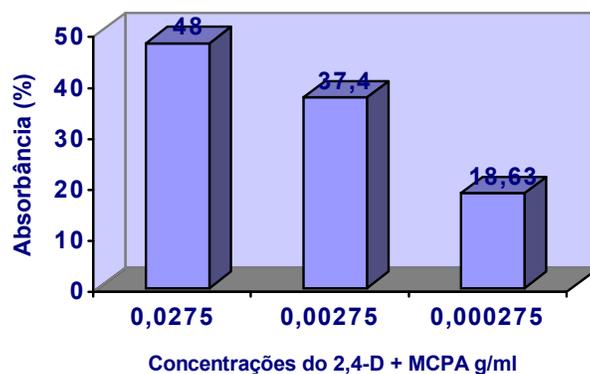


Fig. 2. Representação gráfica da porcentagem de absorvância obtida em teste de citotoxicidade *in vitro* de células hepáticas de *M. roosevelti* em cultivo expostas a diferentes concentrações do herbicida 2,4 - D+MCPA.

Os valores obtidos na tabela 2, demonstram que em células afetadas, a absorvância do “vermelho neutro” diminui em comparação com a das células controle. Os lisossomas das células viáveis irão absorver o “vermelho neutro”, portanto com a adição do etanol 50% mais ácido acético para a extração do corante, a solução se tornará mais corada, sendo proporcional ao número de células viáveis, ou seja, que não foram submetidas aos efeitos do 2,4-D+MCPA (Fig. 1 e 2).

Apesar de ambos os testes de citotoxicidade, terem se complementado, recomenda-se, que para o teste da absorvância, segundo a metodologia descrita anteriormente, sejam utilizadas células de linhagem já estabelecida, pois foi verificado uma pequena variação nas leituras de absorvância dos pocinhos da microplaca. A hipótese é de que o cultivo celular primário não apresenta uma uniformidade na densidade da monocamada, como as células de linhagem já estabelecida, além disso, a atividade enzimática dessas células, por não serem genotipicamente iguais, varia muito de lote para lote.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHNE, W. Studies on the fish tissue cultures for toxicity tests in order to reduce and replace the fish tests. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B.* **180**:480-504, 1985.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Fathead minnow FHM cells for use in *in vitro* Cytotoxicity assays of aquatic pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **14**, p. 78-87, 1987a.
- BABICH, H. e BORENFREUND, E. *In vitro* cytotoxicity of organic pollutants to bluegill Sunfish (BF-2) Cells. *Environmental Research.* **42**, p. 229-237, 1987b.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Aquatic pollutants tested *in vitro* with early passage fish cells. *ATLA.* **15**, 116 -122, 1987c.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a Review. *Toxic. in Vitro.* **5**(1):91-100, 1991d.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Fathead minnow FHM cells for use in *in vitro* cytotoxicity assays of aquatic pollutants. *Ecotoxicol. and Environ. Safety.* **14**, 78-87, 1987e.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. *In vitro* cytotoxicity of organic pollutants to bluegill sunfish (BF-2) Cells. *Environ. Research.* **42**, 229 - 237, 1987f.
- BABICH, H.; PALACE, M.R.; STERN, A. Oxidative stress in fish cells: *in vitro* studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **24**, 173-178, 1987.
- BERQUÓ, E.S.; PACHECO DE SOUZA, J.M.; GOTLIEB, S.L.D.; Bioestatística 1 ed. rev São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária Ltda, p. 350, 1981.
- BOLS, N.C.; BOLISKA, S.; DIXON, D.G.; HUDSON, P.V.; KAISER, K.L.E. The Use of Cell cultures as na indicator of contaminant toxicity to fish. *Aquatic Toxicol.* **6**:147-1155, 1985.
- CASTAÑO, A.; VEGA, M.M.; TARAZONA, J.V. Acute toxicity of selected metals and phenols on RTG - 2 and CHSE - 214 fish cell lines. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **55**, 222-229, 1995.
- CHENG, L.L.; BOWSER, P.R.; SPITSBERGEN, M. Development of cell cultures derived from lake trout liver and kidney in a hormone-supplemented, serum-reduced medium. *Journ. of Aquatic Animal Health.* **5**, 119-126, 1993.
- DIPPLE, A.; BIGGER, C.A.H. Metabolic properties of “in vitro” systems. In: cellular systems for toxicity testing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **407**:26-33, 1983.
- FLOURIOT, G.; VAILLANT, C.; SALBERT, G.; PELISSERO, C.; GUIRAUD, J.M.; VALOTAIRE, Y. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates. *J. of Cell Science.* **105**, 407-416, 1993.
- HAKANSSON, H.; SUNDIN, P.; ANDERSSON, T.; BRUNSTROM, L.; DENCKER, L.; ENGWALL, M.; EWALD, G.; GILEK, M.; HOLM, G.; HONKASALO, S.; IDESTAM-ALMIQUIST, J.; JONSSON, P.; KAUTSKY, N.; LUNDBERG, G.; LUND-KVERNHEIM, A.; MARTINSEN, K.; NORRGREN, L.; PERSONEN, M.; RUNDGREN, M.; STALBERG, M.; TARKPEA, M.; WESEN, C. *In vivo* and *in vitro* toxicity of fractionated fish lipids, with particular regard to their content of chlorinated organic Compounds. *Pharmacol. & Toxicol.* **69**, 459-471, 1991.
- HAWKINS, W.E. Carcinogenic tests with small fish species. *Aquat. Toxicol.* **11**:00-00, 1987.
- HAYASHI S.; OOSHIRO, Z. Primary culture of the Eel hepatocytes in the serum-free medium. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* **52**(9):1641-1651, 1986.
- HIGHTOWER, L.E. & RENFRO, J.L.. Recent applications of fish cell culture to biomedical research. *The Journ. of Exp. Zool.*, **248**, 290 - 302, 1988.
- HIRATA, K.; YOSHIDA, Y.; SHIRAMATSU, K.; FREEMAN, A.E.; HAYASAKA, H. Effects of laminin, fibronectin and type IV collagen on liver cell cultures. *Expl. Cell Biol.* **51**, p 121-129, 1993.
- KOCAL, T.; QUINN, B.A.; SMITH, J.R.; FERGUSON, H.W.; HAYES, M.A. Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *In Vitro Cellular & Developmental Biology.* **24**(4):304-308, 1987.
- KOCAN, R.M.; SABO, K.M.; LANDOLT, M.L. Cytotoxicity/genotoxicity: the application of cell culture techniques to the measurement of marine sediment pollution. *Aquatic Toxicol.* **6**, 165-177, 1984.
- LIPSKY, M.M.; SHERIDAN, T.R.; BENNETT, R.O.; MAY, E.B. Comparison of trout hepatocyte culture on different substrates. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.* **22**(6):360-362, Jun, 1986.
- PARKINSON, C.; AGIUS, C. Acute toxicity of DDT to Tilapia (*Oreochromis spirulus* Gunther) *in vivo* and *in vitro*. *ATLA.* **15**, 298 - 302, 1988.
- RACHLIN, J.W.; PERLMUTTER, A. Fish cells in culture for study of aquatic toxicants. *Water Research Pergamon Press.* **2**:409-414, 1968.
- SAITO, H.; SHIGEOKA, T. Comparative cytotoxicity of chlorophenols to cultured fish cells. *Environ. Toxicology and Chem.* **13**, **10**:1649-1650, 1994.

- SAITO, H.; SUDO, M.; SHIGEOKA, T. & YAMAUCHI, F.. *In vitro* cytotoxicity of chlorophenols to Goldfish GF - scale (GFS) cells and quantitative structure - activity relationships. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 10, 235 - 241, 1991.
- SALVO, L.M. Estudo do citotoxicidade “*in vitro*” de clorofenoxiacetatos de células hepáticas de *Metynnis roosevelti* (PISCES, CHARACIDAE). Tese de mestrado. Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 1997.
- SEGNER, H.; LENZ, D.; HANKE, W.; SCHURMANN, G. Citotoxicity of metals toward rainbow trout R1 cell line. *Environ. Toxicol. and Water Quality: An International Journ.* 9, 273-279, 1994.
- WATANABE, T.; NAKANO, M.; ASAKAWA, H.; MORITOMO, T. Cell culture of rainbow trout liver. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 53, 4:537-542, 1986.
- WOLF, K.; QUIMBY, M.C. Fish cell and tissue culture. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J., eds. *Fish Physiology.* 3, 253-305, 1969.