



# APLICAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA O ESTUDO DA GENOTOXICIDADE DO HPA BENZO[A]PIRENO (BaP) EM ORGANISMOS MARINHOS, ATRAVÉS DA RELAÇÃO TRÓFICA ENTRE CAMARÕES *XIPHOPENAEUS KROYERI* E PEIXES *TRACHINOTUS CAROLINUS*.

<u>M. Ito </u><sup>1</sup>

A.J.S. Rocha; V. Gomes; A.C.R.A. Barbosa; T.C.A. Santos; M.J.A.C.R. Passos; M. C. Bicego; F.M. Hasue; V.G. Phan

Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, Departamento de Oceanografia Biológica, Praça do Oceanográfico, n<sup>o</sup> 191, Cidade Universitária, 05508 - 120, São Paulo, Brazil.

<sup>1</sup>maysito@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são uma classe de poluentes orgânicos amplamente distribuídos no ecossistema marinho, originados a partir de fontes naturais ou antropogênicas. (Medeiros & Bicego, 2004). O Benzo[a]pireno (BaP) é um HPA de alto peso molecular e apresenta característica hidrofóbica, responsável pela acumulação em sedimentos e em organismos (Newman & Unger, 2003). Este composto apresenta capacidade de causar danos ao DNA, de formar metabólitos na bile e adução no DNA de células do fígado (Hook & Lee, 2004; Rocha, *et al.*, 007). Essas alterações podem ser os primeiros indícios do início de uma carcinogênese em organismos expostos a este xenobiótico (Telli - Karakoç *et al.*, 002). O acúmulo de HPA pode levar à contaminação da cadeia alimentar, através das relações tróficas entre os organismos (Palmqvist *et al.*, 006).

Inúmeros estudos de monitoramento ambiental são capazes de detectar os tipos e as concentrações dos HPAs encontrados em áreas contaminadas, através do uso de biomarcadores. Atualmente o ensaio cometa tem sido utilizado para detectar danos no DNA induzidos por substâncias como agentes alquilantes (alteram ou evitam duplicação celular), intercalantes (causam inserções ou deleções no DNA) e oxidativos (Henderson *et al.*, 998). O método tem provado ser um sistema eficiente para classificar substâncias químicas e misturas complexas por sua toxicidade ao material genético (Cotelle & Ferard, 1999), além de proporcionar um sistema rápido e sensível para estudos de monitoramento ambiental quando aplicados em vegetais e animais (Anderson *et al.*, 998). A genotoxicidade resultante pode ser avaliada através do ensaio cometa, utilizando diferentes tipos celulares, provenientes do fígado, medula óssea, sangue, hemolinfa, brânquias, entre outros (Mitchellmore &

Chipman, 1998). Entretanto, poucos estudos investigaram a genotoxicidade decorrente das relações tróficas (Lemiere *et al.*, 005).

Diferentes modos de contaminação e concentração de HPA são conhecidos em organismos marinhos, de acordo com o hábito alimentar, nível trófico e habitat. A despeito da capacidade de biotransformação, a concentração de HPA nas presas e a quantidade das mesmas consumidas pelos predadores condicionam os processos de acumulação destes compostos na cadeia trófica (Baumard *et al.*, 998). Desse modo, mesmo não havendo a exposição direta, predadores de animais contaminados por hidrocarbonetos podem estar sujeitos ao efeito genotóxico causado pelos metabólitos (espécies reativas de oxigênio, ou ROS, do inglês "Reactive Oxygen Species") que são produzidos durante a biotransformação dos HPA. Esses metabólitos, que podem ser encontrados na bile dos organismos, também são biomarcadores utilizados para determinar a presença de contaminantes em ambientes impactados (Silva *et al.*, 006).

## OBJETIVOS

O trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do Benzo[a]pireno, um hidrocarboneto policíclico aromático, na cadeia trófica, através da quantificação de dano causado ao material genético e determinação de níveis de metabólitos da bile de peixes *Trachinotus carolinus* (pampus) alimentados com camarões da espécie *Xiphopenaeus kroyeri* previamente expostos a diferentes concentrações desse hidrocarboneto.

## MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Aclimação

Os camarões *X. kroyeri* foram coletados na região costeira de Ubatuba - SP utilizando - se uma rede de arrasto - de fundo, acoplada à embarcação "Veliger II". Os animais em melhor estado aparente foram aclimatados às condições experimentais de temperatura a 22<sup>o</sup> C ( ±1) e de salinidade a 35 ( ±1), por 30 dias. Os peixes da espécie *T. carolinus* foram coletados na zona de arrebentação da Praia da Enseada, em Ubatuba, por meio de arrasto de rede do tipo "Picaré". Os peixes, entre 5 e 20 centímetros, aproximadamente, foram escolhidos e aclimatados às condições experimentais de temperatura a 22<sup>o</sup> C ( ±1) e de salinidade a 35 ( ±1), cujos valores estão incluídos nos intervalos de variação desses fatores no ambiente natural da espécie.

#### Desenho Experimental

Para a realização destes experimentos, 5 grupos de pampos foram mantidos em reservatórios distintos. Cada grupo de peixes foi alimentado diariamente, durante 5 dias, com camarões mantidos durante 24 horas em água limpa ou no DMSO (dimetil sulfóxido) - solvente do BaP ou expostos a uma das seguintes concentrações: 100, 200 e 400 µg/L de BaP. Os camarões foram sacrificados por decapitação, moídos e oferecidos aos peixes em pequenas porções. Após o período de alimentação, coletou - se sangue dos peixes para o ensaio cometa e, então, foram sacrificados, sendo submetidos a choque térmico em água gelada, para a coleta da bile dos indivíduos, para realização da quantificação de metabólitos parentais de benzo[a]pireno.

#### Ensaio Cometa

O grau de dano do DNA eritrocitário de pampos foi estudado através do ensaio cometa. Amostras de sangue de *T. carolinus* foram extraídas do coração, e colocadas em um pró - vial âmbar contendo PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4). Foram adicionadas 20 µL da mistura (sangue e PBS) a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) preparada à concentração de 1%, mantida à 37<sup>o</sup>C. A agarose LMP contendo as células foi pipetada sobre uma lâmina histológica previamente preparada com uma camada de agarose uniformemente distribuída, de ponto de fusão normal (NMP), na concentração 1,5%. Após a adição da agarose LMP com células, as lâminas foram cobertas com lamínulas para espalhar essa mistura e resfriadas a 4<sup>o</sup>C. Após a solidificação da mistura, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise, que é composta por NaCl 2,5 M EDTA - titriplex III 100 mM, Tris 10 mM, NaOH e Laurilsarcosinato de sódio, em água destilada. Essa solução dissolve e remove membranas celulares, organelas e proteínas histônicas, permanecendo somente o DNA, cujo dano é analisado. Após a lise, as lâminas foram lavadas com solução PBS e, em seguida, transferidas para a cuba eletroforética, onde permaneceram imersas na solução de eletroforese (Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH > 13) por 10 minutos, para que ocorresse o relaxamento da molécula de DNA (unwinding). Após esse período, o material foi submetido à eletroforese por 20 minutos a 20 V e 300 mA, e em seguida, as lâminas foram neutralizadas em solução Tris pH 7,5 e fixadas com etanol. Por fim, o material foi corado utilizando - se solução de nitrato de prata (Garcia *et al.*, 004. As lâminas foram fotografadas ao acaso, por meio de microscopia óptica (Nikon®), acoplada a uma câmera digital (SAMSUNG SDR 312®) e a um "software"

para a digitalização das imagens (Ulead Vídeo Studio 7 SE Basic®).

O grau de dano do DNA eritrocitário dos peixes foi analisado com o auxílio do "software" Comet Score™ (Tritek Corporation). Este "software" foi desenvolvido para análise de imagens fluorescentes ao ultravioleta em fundo preto. Neste trabalho, as células fotografadas são pretas em fundo branco devido à coloração com nitrato de prata e, para que pudessem ser analisadas pelo programa "Comet Score", as *macros* tiveram que ser invertidas através do "Image Converter Software". Foram analisadas cerca de 100 células por lâmina, por indivíduo. O "software" fornece 16 parâmetros relativos à danificação do DNA de cada célula analisada. Neste trabalho, utilizou - se o parâmetro "Olive Moment-OM" ou Momento de Cauda Olive. O Momento de Cauda Olive resulta da multiplicação do percentual de DNA presente na cauda pelo tamanho da mesma, sendo o tamanho caudal delimitado a partir do centro do núcleo celular até o extremo caudal de maior densidade óptica e, portanto, apresenta como vantagem o uso de dois parâmetros em apenas um número.

#### Análise de Metabólitos Parentais de BaP

A concentração dos metabólitos parentais de BaP foi determinada em amostras de bile dos peixes *T. carolinus* alimentados com camarões expostos a concentrações do HPA, DMSO e água limpa. Devido ao pequeno volume de bile amostrada, os conteúdos foram agrupados em um único frasco para cada caso, a fim de se obter de volume suficiente para realizar a análise adequadamente. As análises dos metabólitos de benzo[a]pireno presentes na bile dos peixes, alimentados com camarões expostos ao BaP, foram desenvolvidas segundo metodologia proposta por Krahn *et al.*, (1984) com modificações. Neste caso, não há a separação quantitativa de cada um dos metabólitos individuais provenientes de cada HPA original. Portanto, o valor dado para a quantificação refere - se ao total de metabólitos que possuem os mesmos comprimentos de onda dos metabólitos do BaP, chamados de equivalentes por grama de bile. As separações foram feitas através da injeção direta das amostras de bile previamente descongeladas, por injeção direta em Cromatógrafo Líquido de Alta Precisão (HPLC) "Agilent 1200 series" acoplado a um detector de fluorescência (HPLC/F) "Agilent 1200 series". A coluna analítica utilizada foi de fase reversa "Phenomenex Synergi hydro - RP 80A" com dimensões de 150 x 4,6 mm, preenchida com partículas de sílica C18 de 4 µm. Um filtro de pré - coluna A - 318 da Upchurch de 0,5 µm e uma pré - coluna RP - 18 1602 da Upchurch empacotada com sílica C18 foram usados para a proteção da coluna, evitando sua contaminação e sua degradação. Como fase móvel, utilizou - se a solução ácido acético/água milli - Q (5 L/L) e metanol grau HPLC. A temperatura do forno foi 50<sup>o</sup>C. Programou - se a excitação e emissão do detector de fluorescência para o seguinte par de valores de excitação/emissão: 380/430 nm, os quais são valores previamente calibrados para equivalentes de metabólitos de benzo[a]pireno. Como padrão externo utilizou - se uma solução contendo BaP em diferentes concentrações conhecidas, sendo esta também usada para a quantificação dos compostos, que foi feita através da relação entre o fator de resposta do padrão externo e a área total de

cada cromatograma. Para controle do método, foi utilizada uma amostra real de bile, obtida a partir de peixes expostos aos HPA de concentrações conhecidas.

#### Análise Estatística

Para análise dos dados referentes aos danos do DNA eritrocitário de *T. carolinus*, embora tenha havido distribuição normal dos dados, a ausência de homogeneidade de variâncias indicou a utilização dos métodos estatísticos não - paramétricos Kruskal - Wallis ANOVA, seguido pelo teste Mann - Whitney U - test, para verificar diferenças significativas entre cada caso, considerando  $p < 0,05$ . Os efeitos do BaP nos peixes através da relação trófica com camarões *X. kroyeri* foram comparados em relação aos grupos controle em água pura, grupo DMSO e entre as diferentes concentrações do HPA. A correlação dos dados de metabólitos com momento de cauda olive foi analisada através de regressão linear. Foi utilizado o log das médias, pois os dados de metabólitos foram insuficientes.

## RESULTADOS

Os HPA de alto peso molecular são facilmente encontrados em tecidos de organismos aquáticos, como bivalves, gastrópodes, crustáceos e peixes, coletados em locais contaminados (Al - Yakoob, 1994; Mostafa, 2002; Orbea *et al.*, 002), pois possuem grande afinidade por moléculas orgânicas (Newman & Unger, 2003). Os animais marinhos, desde invertebrados até mamíferos, possuem diferentes capacidades de metabolização dos HPA. De um modo geral, os peixes são mais eficientes do que os invertebrados na transformação dos HPA em metabólitos, devido à maior quantidade de enzimas relacionadas a este processo (Livingstone, 1998). Os invertebrados apresentam atividade metabólica relativamente baixa o que reduz a capacidade de biotransformação dos HPA, cuja acumulação no organismo pode ser transferida, contaminando seus predadores (Lemiere *et al.*, 005).

Neste estudo, foi possível observar que os danos do material genético ocorreram devido à alimentação com presas contaminadas. A partir dos dados de Momento de Cauda Olive foi calculada a mediana para cada peixe, e para cada grupo de exposição foi obtida a média das medianas. Para o grupo controle água pura, a média foi de 2,61 ( $\pm 0,47$ ); no grupo controle DMSO, foi de 2,23 ( $\pm 0,29$ ); para o grupo BaP 100 foi de 3,34 ( $\pm 0,29$ ); para o grupo BaP 200, a média foi de 6,24 ( $\pm 1,98$ ) e para o grupo BaP 400 foi de 11,52 ( $\pm 4,62$ ). Esses dados permitem visualizar aumento na danificação do material genético, de acordo com a concentração de BaP a que os camarões foram expostos. De acordo com o teste estatístico não - paramétrico Kruskal - Wallis ANOVA, houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,001$ ). Através do teste não - paramétrico Mann Whitney U - test, foram avaliadas as diferenças significativas entre cada caso. Entre os grupos controle água pura e DMSO ( $p=0,3272$ ) e os grupos controle água e BaP 100 ( $p=0,3865$ ) não houve diferenças significativas. Entre o grupo controle água pura e BaP 200 ( $p=0,0143$ ) e o grupo controle água pura e BaP 400 ( $p=0,0143$ ) houve diferenças significativas. Para o grupo controle DMSO, não houve diferença significativa em relação ao grupo BaP 100 ( $p=0,0864$ ). No entanto,

assim como ocorreu com a água pura, houve diferenças significativas em relação aos grupos BaP 200 ( $p=0,0903$ ) e BaP 400 ( $p=0,0090$ ). O grupo BaP 100 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo BaP 200 ( $p=0,0864$ ), entretanto, em relação ao grupo BaP 400 apresentou diferença ( $p=0,0143$ ). Entre os grupos BaP 200 e BaP 400 houve diferença significativa ( $p=0,0163$ ).

Estudos anteriores comprovam a presença do xenobiótico em peixes alimentados com organismos previamente expostos através do aumento de atividade enzimática e formação de adutos no tecido hepático. Reynolds *et al.*, (2003) observaram, através do aumento da atividade enzimática e metabólitos da bile, que peixes da espécie *Platichthys flesus* L. adquiriram HPA da alimentação, que consistia de ração contaminada com mistura de quatro tipos de HPA (inclusive BaP). Rice *et al.*, (2000) realizaram experimento em que peixes foram alimentados com poliquetas expostas a sedimentos contaminados por BaP. Estes peixes apresentaram no final do experimento alta atividade do CYP1A nos hepatócitos e na mucosa do intestino superior, além de adutos HPA - DNA no tecido hepático.

Os níveis de metabólitos parentais de BaP presentes na bile dos pampos também evidenciam a contaminação dos peixes pelo HPA, sendo que, apresentaram concentrações iguais a 0,52  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 0,06$ ) no grupo controle água pura; 3,35  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 1,34$ ) no grupo BaP100; 5,65  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 0,78$ ) no grupo BaP200 e 7,40  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 0,42$ ) no grupo BaP 400. A equação da regressão linear ( $y=1,4495x - 0,2058$ ), entre o momento de cauda olive e os níveis de metabólitos encontrados na bile, forneceu coeficiente de correlação de Pearson ( $R=0,97$  e  $R^2=0,95$ ) demonstrando forte correlação entre os dados. O BaP é considerado carcinogênico, entretanto, em alguns casos, não é a substância efetivamente responsável pela carcinogênese (Rand,1995). O xenobiótico apresenta capacidade de ativar o sistema citocromo P - 450 nos organismos que inicia o metabolismo do composto. Essa transformação, no entanto, pode gerar metabólitos carcinogênicos, que são radicais reativos que podem se ligar covalentemente a uma variedade de biomoléculas, inclusive ao DNA, formando adutos (Shugart, 2000) que geram instabilidades e fragilidades, transformando ou até mesmo causando a destruição do DNA (James *et al.*, 004). Os níveis de metabólitos, presentes na vesícula biliar, verificados no grupo controle mantiveram - se cerca de 6 a 10 vezes menores do que aqueles dos grupos de peixes alimentados com camarões expostos ao BaP. Além disso, aumentaram proporcionalmente à concentração do BaP nos grupos de peixes alimentados com camarões expostos, corroborando os resultados do ensaio cometa.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que as concentrações de benzo[a]pireno utilizadas na exposição dos camarões afetam seus predadores através da cadeia trófica. Tal fato foi comprovado com o aumento de quebras no material genético dos peixes da espécie *T. carolinus* alimentados com os camarões da espécie *X. kroyeri* contaminados, sendo que as quebras foram proporcionais às concentrações a que os camarões foram expostos. Além disso, os níveis dos metabólitos da

bile dos peixes também se comportaram da maneira crescente, proporcionais às concentrações de BaP das presas.

(À FAPESP-Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 2007/01012 - 1) e ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.)

## REFERÊNCIAS

- Al - Yakoob, S.N., Saeed, T., Al - Hashash, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: exposure assessment for Kuwaiti consumers after the gulf spill of 1991. *Environmental International*, 20(2): 221 - 227,1994.
- Anderson, D., Yu, T.W., McGregor, T.B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, 13 (6): 539-555, 1998.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J. C., Burgeot, T., Bellocq, J. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.*, 36 (12): 951 - 960, 1998.
- Cotelle, S., Ferard, J.F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis.*, 34 (4): 246-255, 1999.
- García, O., Mandina, T., Lamadrid, A.I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, A., Piloto, J., Gonzalez, J. E., Alvarez, A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter - laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat. Res.* 556: 25 - 34, 2004.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windbank, S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis.*, 13 (1): 89 - 94, 1998.
- Hook, S.E., Lee, R.F. Interactive effects of UV, benzo[a]pyrene, and cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Mar. Environ. Res.*, 58: 735-739, 2004.
- James, M.O., Kleinow, K.M., Zhang, Y., Zheng, R., Wang, L., Faux, L.R. Increased toxicity of benzo[a]pyrene - 7,8 - dihydrodiol in the presence of polychlorobiphenyls. *Mar. Env. Res.*, 58: 343 - 346, 2004.
- Krahn, M.M., Meyers, M.S., Burrows, D.G., Malins, D.C. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica.*, 14 (8): 633 - 646, 1984.
- Lemiere, S., Cossu - Leguille, C., Bispo, A., Jourdain, M.J., Lanhers, M.C., Burnel, D., Vasseur, P. DNA damage measured by the single - cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the "Erika" oil - spill. *Mutat. Res.*, 581: 11-21, 2005.
- Livingstone, D.A. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120: 43 - 49, 1998.
- Medeiros, P.M., Bicego, M.C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. São Sebastião, SP - Brasil. *Mar. Pollut. Bull.*, 49:892 - 899, 2004.
- Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, 399: 135-147, 1998.
- Mostafa, G.A. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood from Lake Timsah. *International Journal of Environmental Health Research*, 12: 83 - 91, 2002.
- Newman, M.C. & Unger, M.A. *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2. ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003, 458p.
- Orbea, A., Ortiz - Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajarville, M.P. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.*, 58: 75-98, 2002.
- Palmqvist, A., Rasmussen, L.J., Forbes, V.E. Influence of biotransformation on trophic transfer of the PAH, fluoranthene. *Aquat. Toxicol.*, 80: 309-319, 2006.
- Rand, G.M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. 2 ed. Washington: Taylor & Francis, 1995, 1125p.
- Reynolds, W.J., Feist, S.W., Jones, G.J., Lyons, B.P., Sheahan, D.A., Stentiford, G.D. Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. *Chemosphere*, 52: 1135-1145, 2003.
- Rice, C.A., Myers, M.S., Willis, M.L., French, B.L., Casillas, E. From sediment bioassay to fish biomarker connecting the dots using simple trophic relationships. *Mar. Environ. Res.*, 50: 527-533, 2000.
- Rocha, A.J.S., Gomes, V., Santos, T.C.A., Passos, M.J.A.C.R., Hasue, F.M., Phan, V.N. Genotoxicidad del hidrocarburo benzo[a]pireno a través de la relación trófica presa - predador. 1er Congreso de Ciencias del Mar del Perú, Peru, 2007.
- Shugart, L.R. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9: 329 - 340, 2000.
- Silva, D.A.M., Buzitis, J., Krahn, M.M.; Bicego, M.C., Vanin, A.M.S.P. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Mar. Pollut. Bull.*, 52: 175-183, 2006.
- Telli - Karakoç, F., Ruddock, P.J., Bird, D.J., Hewer, A.; Van Schanke, A., Phillips, D.H., Peters, L.D. Correlative changes in metabolism and DNA damage in turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to benzo[a]pyrene. *Mar. Environ. Res.*, 54: 511-515, 2002.