

AVALIAÇÃO DE MUTAGÊNESE PROVOCADA POR SULFATO DE FERRO ATRAVÉS DO TESTE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

Francisco Carlos da Silva¹, Miguel Ângelo de Brito Barros², Rafaelle Razário Viana³, Natalia Faria Romão⁴, Massai de Sousa Oliveira⁵, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti⁶.

1. Biólogo Bacharelado com ênfase em ecologia, Mestrando em Genética e Toxicologia Aplicada. Chefe dos laboratórios do Centro Universitário Luterano de Ji-paraná (CEULJI/ULBRA).

2. Agrônomo, Mestrando em Genética e Toxicologia Aplicada.

3. Bióloga Licenciada, Mestranda em Genética e Toxicologia Aplicada. Docente do Centro Educacional São Paulo (CEDUSP/ULBRA).

4. Bióloga Bacharelado com ênfase em ecologia, Mestranda em Genética e Toxicologia Aplicada. Docente do Centro Educacional São Paulo (CEDUSP/ULBRA).

5. Farmacêutico e Bioquímico, Mestranda em Genética e Toxicologia Aplicada. Docente do Centro Universitário Luterano de Ji-paraná (CEULJI/ULBRA).

6. Biólogo Bacharelado com ênfase em ecologia, Mestre em Genética e Toxicologia Aplicada. Docente e Coordenador de Extensão da Faculdade de Educação e Meio Ambiente (FAEMA).

dionatasmenguetti@faema.edu.br

RESUMO:

Micronúcleos definem-se como pequenos corpos contendo DNA e localizados no citoplasma. Os mesmo aparecem na telófase e são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos, originados de quebras isocromatídicas, cromatídicas, ou de disfunções do fuso mitótico, podendo aparecer mais de uma vez por células. O presente estudo objetivou analisar os efeitos mutagênicos causados sulfato de ferro utilizado o teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos, para averiguar a eficácia metodológica a ser aplicada em pesquisas de toxicidade e mutagênicidade de plantas amazônicas, aprovado pelo (CEP 2010-007A ULBRA). Foram realizadas correlação (PCR/NCE) em 1000 células da medula óssea dos camundongos e contagem de micronúcleos em 2000 (PCEs). Constatou-se através da correlação (PCE/NCE) que houve citotoxicidade ou depressão celular nas células da medula óssea do camundongo tratado com (CP), os dados também mostraram que houve atividade mutagênica

Artigo/Article

nos camundongos tratados com (CP) já que a média da frequência de micronúcleos foi de (9,5/1000 PCEs), sendo essa metodologia indicada para aplicação em estudos de mutagenicidade. É importante ressaltar que esse foi o primeiro estudo que utilizou a técnica de micronúcleo para análise mutagênica no estado de Rondônia.

Palavras-chave: Sulfato de ferro, Mutagenicidade e Micronúcleo.

ABSTRACT:

Micronuclei are defined as small bodies containing DNA and localized in the cytoplasm. The same appear in telophase and are derived from chromosomal fragments originated from isochromatid breaks, chromatid, or dysfunction of the mitotic spindle and may appear more than once per cell. This study aimed to analyze the mutagenic effects caused by iron sulfate, used the micronucleus test in bone marrow cells of mice to ascertain the effectiveness methodology to be applied in studies of toxicity and mutagenicity of Amazon plants, approved by (CEP 2010-007A ULBRA). were performed correlations (ECP / ECN) in 1000 bone marrow cells of mice and enumeration of micronuclei in 2000 (ECPs). It was found through correlation (ECP / ECN) that there was cellular cytotoxicity or depression in the bone marrow cells of mice treated with (CP), the data also showed that there were mutagenic activity in mice treated with (CP) longer than the average MN frequency was (9.5 / ECPS 1000), and this methodology suitable for application in mutagenicity studies. is important to note, this was the first study using the micronucleus technique for analyzing mutagenic in Rondonia state.

Keywords: Iron sulphate, Mutagenicity and Micronucleus

1. INTRODUÇÃO

Mutação é uma alteração súbita e herdável na estrutura do material genético e como tal, é uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos (BURNS e BOTTINO, 1991; JORGE, 2005). Entretanto, em curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é

quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e, finalmente, sintonizados, de um organismo (ALBERTS *et al.*, 2002; JORGE, 2005).

Micronúcleos definem-se como pequenos corpos contendo DNA e localizados no citoplasma (Figura 1).

Artigo/Article

Os mesmos aparecem na telófase e são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos, originados de quebras

isocromatídicas, cromatídicas, ou de disfunções do fuso mitótico, podendo aparecer mais de uma vez por células (RIBEIRO *et al.*, 2003).

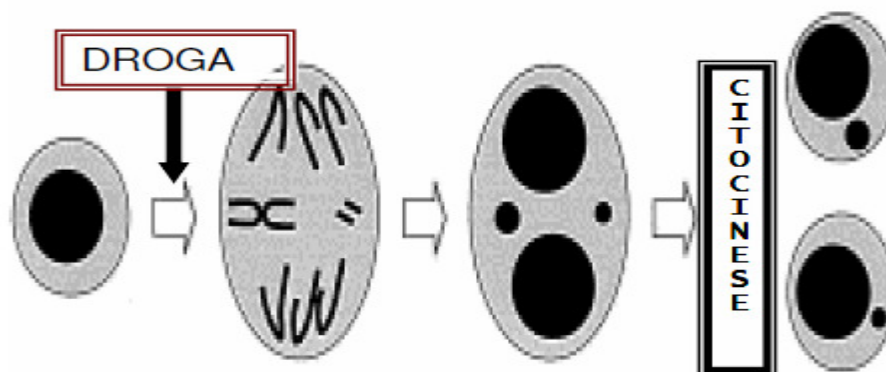


Figura 1. Formação de micronúcleos em células (UFMG, 2011)

O teste de micronúcleos é um dos testes mais utilizados para detecção de agentes clastogênicos (quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR *et al.*, 1987; HAYASHI *et al.*, 1994).

Normalmente sua presença é analisada em eritrócitos policromáticos, um eritrócito imaturo, em um estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda contém ribossomos, de medula óssea de camundongos, mas pode, também, ser analisada em eritrócitos

normocromáticos um eritrócito maduro, sem ribossomos (CHOY, 2001).

Porém é necessária a divisão celular após a mutagênese sendo assim o cultivo celular é imprescindível ou então o uso de células em constante multiplicação como as de medula óssea. (VILELA *et al.*, 2003).

Sua sensibilidade e precisão juntamente com a detecção de perda cromossômica caracterizam as principais vantagens do teste de micronúcleos (RIBEIRO, 2003).

O presente estudo objetivou analisar os efeitos mutagênicos

Artigo/Article

causados sulfato de ferro utilizado o teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos, para averiguar a eficácia metodológica a ser aplicada em pesquisas de toxicidade e mutagenicidade de plantas amazônicas, aprovado pelo (CEP 2010-007A ULBRA).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Tratamento dos animais

Os testes foram realizados em dois camundongos, sendo um controle negativo com aplicação de H₂O e outro controle positivo com aplicação de agente mutagênico. A aplicação se deu por *gavage* (dose oral), de 5mg/kg de H₂O (controle negativo) e 5mg/kg do agente mutagênico sulfato de ferro (controle positivo), 24 horas antes do início dos testes (Figura 2).



Figura 2. A – Pesagem dos camundongos. B – Aplicação por *gavage* do sulfato de ferro. (Imagens: Dionatas Meneguetti)

2.2. Preparo do tampão fosfato

Foram preparadas as soluções (A e B) em separado. Para preparo

da solução (A), adicionou-se 27,6 gramas de fosfato de potássio monobásico anidro KH₂PO₄, por litro do H₂O destilada. Já na solução (B)

Artigo/Article

adicionou-se 35,6 gramas de fosfato de sódio bibásico $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, por litro do H_2O destilada. Em seguida juntou-se 16,5ml da solução (A) com 46ml da solução (B) e acrescentou-se 37,5ml de H_2O destilada, completando os 100ml do tampão fosfato que estava com $\text{PH} = 5,8$.

2.3. Preparo do corante

Adicionou-se 90ml de tampão fosfato e 10ml de Giemsa. A coloração serve para diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE) (Figura 3). Eritrócitos policromáticos (PCE) se coram de azul claro e eritrócitos normocromáticos se coram de vermelho-telha. (RIBEIRO *et al*, 2003).

2.4. Coleta da medula óssea

Os camundongos foram sacrificados por decapitação com o uso de tesoura cirúrgica, a mesma que foi utilizada para retirar os fêmures, onde foram feitos dois

cortes, o primeiro na parte mais dura e o segundo do lado oposto, sendo a coleta de medula óssea realizada com auxílio de uma seringa de insulina, no sentido de caminhar da medula óssea.

2.5. Preparo da lâmina

Foi preparada uma lâmina de cada fêmur, com um total de quatro laminas, sendo duas controle positivo e duas controle negativo. Adicionou-se uma gota de 10 μl de soro fetal bovino por lamina, onde foi feito a homogeneização (com o auxílio de uma espátula) da medula óssea e em seguida feito o esfregaço. As laminas ficaram em repouso (secando) ao ar, em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente as laminas foram fixadas sendo imersas no metanol por 10 minutos e coradas por 7 minutos no corante preparado anteriormente, ambas em cubeta. Decorrido o tempo retirou-se as laminas da cubeta, sendo as mesmas lavadas com H_2O destilada para remover o excesso, e deixadas secar ao ar em temperatura ambiente.

Artigo/Article

2.6. Microscopia – Análise de micronúcleos

A contagem de micronúcleos se deu em 2000 células de medula óssea do camundongo, sendo 1000 em cada fêmur. A visualização das lamínas foi feita em óleo de imersão, com objetiva de 100X e ocular 10X.

Foram analisadas 04(quatro) lamínas: as de número 1 e 2 controle negativo, 3 e 4 controle positivo. A contagem iniciou-se com 500 células de PCE e NCE onde é feita sua correlação e a quantidade de micronúcleos em PCE, posteriormente a contagem continuou apenas com PCE e micronúcleos até um total de 1000 células (Figura 3).

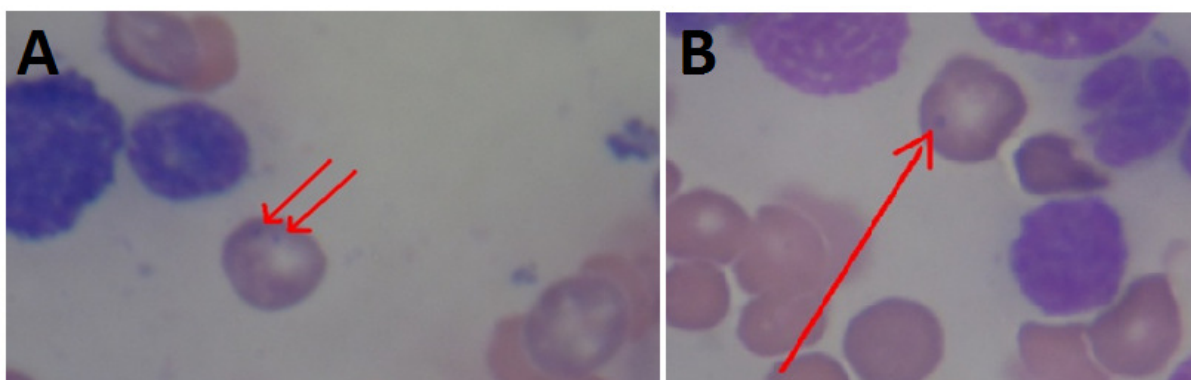


Figura 3. A - Eritrócito policromático (PCE) com dois micronúcleos. B - eritrócito policromático (PCE) com um micronúcleo. (Imagens: Dionatas Meneguetti).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A correlação (PCE/NCE) no (CN) foi de 1,04 e no (CP) foi de 0,65 conforme (Tabela 1).

Essa diminuição na proporção de (PCE) em relação a (NCE) é um parâmetro que mostra que houve citotoxicidade ou depressão celular no camundongo tratado com (CP) (SHAHRIM *et al.*, 2006).

Artigo/Article

Tabela 1. Relação (PCE/NCE) em células da medula óssea dos camundongos.

Laminas	Numero de células	(NCE)	(PCE)	Correlação (PCE/NCE)	
C -	1	500	265	235	0,89
	2	500	225	275	1,22
	Total	1000	490	510	1,04
C +	3	500	319	181	0,57
	4	500	286	214	0,75
	Total	1000	605	395	0,65

A quantidade de (MN/1000 PCEs) no (CN) foi de 2 e no (CP) foi de 9,5 conforme (Tabela 2), mostrando que o (CN) funcionou e que o (CP) provocou uma ação

mutagênica, tendo em vista que a frequência normal de (MN) é de até 3 (MN/1000 PCEs). (RABELLO-GAY *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003).

Tabela 2. Micronúcleos em (PCEs) da medula óssea dos camundongos.

Laminas	Numero de células	(MN/1000 PCEs)	
C -	1	1000	2
	2	1000	2
	Total	2000	2
C +	3	1000	11
	4	1000	8
	Total	2000	9,5

4. CONCLUSÃO

Constatou-se através da correlação (PCE/NCE) que houve

citotoxicidade ou depressão celular nas células da medula óssea do camundongo tratado com (CP), os dados também mostraram que houve

Artigo/Article

atividade mutagênica nos camundongos tratados com (CP) já que a média da frequência de micronúcleos foi de (9,5/1000 PCEs), sendo essa metodologia indicada para aplicação em estudos de mutagênicidade. É importante ressaltar que esse foi o primeiro estudo que utilizou a técnica de micronúcleo para análise mutagênica no estado de Rondônia.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, B. **Fundamentos da Biologia Celular**. Ed Artmed. Porto Alegre, 2002. BURNS, G. W; BOTTINO, P. J. **Genética**. Editora Guanabara Koogan. 6ª edição. Rio de Janeiro, 1991.
2. CHOY, W.N. Regulatory Genetic toxicology tests. In: **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment** (Choy, W.N. ed.), Marcel Dekker, Inc, New York, 93-113, 2001.
3. HAYASHI, M., TICE, R.R., MAC-GREGOR, J.T. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutagênese Ambiental**. Ed Ulbra. Canoas, 2003.
4. MAC-GREGOR, J.T. Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. In: HAYES, A.W; SCHNELL R.C; AND MIYA, T.S. **Developments in Science and Practice of Toxicology**. Ed Elsevier, Amsterdam. 555–558, 1983.
5. MALUF, S.W., ERDTMANN, B. Biomonitorização do Dano Genético em Humanos. In: SILVA, J; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Ed Alcance. Porto Alegre, 2003.
6. Neto, J.X.A., Medeiros, F.P.M. Melo, A.J.M; Silva, J.C., Dantas, J.P. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) *in vivo*. **Rev Bio Ciên Terra**, 5:(2), 2005.
7. RABELLO-GAY, M. N., SILVA, J. C., SILVA, S. Avaliação do possível efeito genotóxico do Gergelim (*Sesamum indicum* L.) através do Teste de Micronúcleos, em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar). **Monografia. Universidade Estadual da Paraíba**. Campina Grande, 2003.
8. RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Ed Ulbra. Canoas, 2003.
9. SHAHRIM, Z., BAHARUDDIN, P. J. N. M., YAHYA, A., MUHAMMAD, H., BAKAR, R. A., ISMAIL, Z. The *in vivo* rodent micronucleus assay of kaci fatimah (*Labisia pumila*) extract. **Trop Biomed**, 23: 214-219, 2006.

Artigo/Article

10. UFMG. **Micronúcleos.**
Disponível em
<<http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2003/micronucleos/sobremn.html>>
Acesso em 08/01/2011.