

Marcelo Schatzmann

ANÁLISE ESTRUTURAL DA CROMATINA DE CÉLULAS
DE FÍGADO E DE CÉREBRO DE *Mimagoniates microlepis*
(família : *Characidae*; subfamília: *Glandulocaudinae*) SOB
CONTAMINAÇÃO DE MERCÚRIO INORGÂNICO (HgCl₂)

Monografia apresentada pelo aluno
Marcelo Schatzmann para adquirir
o título de Bacharel em Ciências
Biológicas na disciplina Estágio em
Biologia Celular pela Universidade
Federal do Paraná. Orientador:
Marco Antonio Ferreira Randi.

Inteligência

“É a capacidade que possui um indivíduo de diminuir ao máximo a dificuldade a ele oferecida.”

Schatzmann, 1997

Agradecimentos

- A DEUS, que na minha compreensão conhece mais de biologia celular e genética do que ninguém e deu-me oportunidade de viver até aqui e contemplar as coisas que deixou evoluir e se transformar por conta própria. Obrigado.
- A minha querida mãe, que apesar não ter a escola primária, me ensinou que estudar era uma coisa boa e apesar de sete filhos legítimos resolveu adotar-me. Com esse pequeno gesto, tirou-me da marginalidade e deu-me a oportunidade de tornar-me um cidadão. Obrigado mãe.
- A minha querida irmã Cida e meu cunhado Paulo. Obrigado pela ajuda financeira, pois sem ela talvez não tivesse concluído a universidade. Me perdoe se alguma vez fui mau interpretado pelo meu gênio difícil.
- A meu orientador Marco Randi, que com paciência soube apresentar minhas falhas e minhas virtudes. Sua seriedade como cientista, sua capacidade, inteligência e preocupação com a veracidade dos fatos registrados, ensinou-me as causas, conseqüências e a árdua tarefa de se fazer ciência. Obrigado pelo seu incentivo.
- Agradeço ao departamento de Biologia Celular e a Universidade Federal do Paraná como um todo, por ter oferecido as instalações e o material necessário para este trabalho.
- A minha irmã Regina que até hoje deixou saudades, talvez algum dia nos veremos no fim deste mistério chamado VIDA. Obrigado pelo amor, carinho e pelas alegrias oferecidas na sua passagem por aqui.
- Ao novo amigo e futuro orientador, Ciro. Sua alegria espontânea, sua lealdade estampada no peito, sempre trouxe um ar de alegria e confiança em sua presença. Obrigado pela co-orientação para a realização deste trabalho que, sem ela tudo seria mais difícil.
- A minha namorada, Helen Cristiane. Que seria eu sem você? Obrigado pela paciência.
- Ao Sebastião e ao Luiz da portaria, a dona Maria da limpeza e a Ana do cafezinho, que sempre me receberam com um bom dia caloroso. A simplicidade lhes fazem de uma grandiosidade tal, que talvez algum dia possa

ser digno de possuir uma alma semelhante.

- Jamais poderia deixar de citar aqui, meus agradecimentos a minha querida amiga Rosane da coordenação do curso de ciências biológicas. Obrigado pelas inúmeras vezes que precisei de seu auxílio e fui atendido.

ÍNDICE

PRÓLOGO.....	1
INTRODUÇÃO	2
MERCÚRIO	4
MERCÚRIO GLOBAL.....	5
A ABSORÇÃO DE MERCÚRIO PELA CÉLULA.....	5
AGENTES QUELANTES	6
OS RISCOS DA EXPOSIÇÃO HUMANA AO MERCÚRIO	6
OBJETIVO	8
MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
COLETA.....	9
ACLIMATIZAÇÃO.....	9
CONTAMINAÇÃO.....	10
CORTES DE SECCÃO	11
PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....	14
CURVA DE HIDRÓLISE.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

PRÓLOGO

Este trabalho apresenta resultados parciais, contendo somente dados registrados sobre o efeito do mercúrio em núcleos de células de fígado, não contendo portanto, dados dos núcleos de células de cérebro e a análise morfométrica que seria realizada em ambos. Entre as causas principais que levaram a ausência destes resultados pode-se citar: a morte dos peixes da primeira coleta, devido ao estresse provocado pela alta fragilidade em função da brusca troca do ambiente natural para o aquário e um mês a mais foi necessário para uma nova coleta e novo período de aclimatização; e problemas no computador, impossibilitando a análise morfométrica dos núcleos até o momento. Este trabalho será finalizado, mas sem tempo hábil para a apresentação nesta monografia.

INTRODUÇÃO

O mercúrio, assim como outros elementos químicos utilizados pelas indústrias após a revolução industrial, entra no grupo de nove milhões de substâncias químicas registradas no “Chemical Abstract Service’s Registry of Chemical”, das quais estima-se que 75 a 80 mil são utilizadas diariamente. Sendo um metal pesado, é um dos principais poluentes que atingem os organismos vivos, e o estudo de seus efeitos pode ser de grande valia na tentativa de controlar seu acúmulo nos vários ecossistemas de nosso planeta (Hoffman, Rattner, Burton e Cairns, 1995).

O efeito agudo do cloreto de mercúrio sobre o epitélio olfatório de *Trichomycterus brasiliensis*, analisado através de microscopia eletrônica de varredura, mostrou alterações drásticas em concentrações $0,1\text{mg HgCl}_2.\text{litro}^{-1}$ e grandes danos a concentração de $0,05\text{mg HgCl}_2.\text{litro}^{-1}$. Entre as modificações registradas neste trabalho destacaram-se alterações em células ciliadas tipo 1 e grande produção de muco por esse epitélio. Em 4 e 12 horas após a contaminação, foram encontradas células epiteliais com pequeno número de cílios (Ribeiro et al., 1994). Trabalhos posteriores demonstraram que estas alterações afetaram sensivelmente a atividade comportamental do peixe e constatou-se mudanças em sua atividade reprodutiva (Ribeiro e Torres, 1995).

O acúmulo de mercúrio inorgânico no peixe tropical *Trichomycterus zonatus* demonstra a difusão, a nível ambiental, a que podem chegar as concentrações de mercúrio proveniente de atividades de mineração em rios na Amazônia brasileira, afetando as populações ribeirinhas na região, que vivem da pesca como fonte de sua

alimentação diária (Ribeiro et al, 1996).

Estudos realizados com indivíduos das espécies *Ambloplites rupestris*, *Lepomis auritus*, *L. gibbosus*, e *L. macrochirus* demonstraram uma capacidade de acumulação de mercúrio superior nas fêmeas em relação aos machos (Ribeiro, 1997).

Espécimes de *Trichomycterus zonatus*, em exposição a $15\mu\text{g.litro}^{-1}$ de cloreto de mercúrio, apresentaram bioacumulação em tecidos de pele, fígado, rim, tubo digestivo e músculo, sendo superior a nível de brânquias e posteriormente alcançando diferentes órgãos através da circulação sanguínea (Ribeiro et al, 1996).

Trabalho com HgCl_2 ($15\mu\text{g.litro}^{-1}$) na epiderme de *Trichomycterus brasiliensis*, com 24 horas de exposição demonstrou haver um aumento no número de linfócitos, o que confirma o efeito secundário da resposta imunológica ao mercúrio (Ribeiro et al, 1996).

Outro relato demonstra a presença de mercúrio no intestino, nefrídio e epiderme do polychaeta marinho *Nereis virens* exposto ao metal, evidenciando que esta espécie absorve mercúrio da água (Baatrup e Jensesn, 1988). Comparado com a concentração média de 9ppm de Hg na água, o fator de bioconcentração (isto é, a concentração de mercúrio no verme dividida pela concentração de mercúrio na água) foi determinado ser 930 depois de 11 dias. Constatou-se a localização de mercúrio dada por estudos de autometalografia de prata no intestino de *Nereis virens*, com células epiteliais apresentando no interior dos lisosomas tais granulações e poucas no citoplasma. Grânulos de prata foram identificados em células tubulares do metanefrídio de órgão excretor.

Extensivos estudos sobre o efeito da contaminação de outros metais como o alumínio sobre a cromatina de fígado e cérebro (Walker, Leblank e Sikorska, 1989) tem obtido resultados significativos, mas trabalhos enfocam a ação do mercúrio a nível de cromatina nos níveis letais e subletais em peixes tropicais .

Mercúrio

Mercúrio é transportado pelo ar, terra e água em todas as escalas, sofrendo transformações entre formas químicas, incluindo mercúrio elementar [Hg^0], mercúrio inorgânico [Hg(II)] e metilmercúrio [CH_3Hg^+]. A forma não polar (Hg^0), é capaz de atravessar membranas biológicas. No estado mercurioso (Hg^+) é pouco estável no ciclo de interconversão biológica e ambiental entre o Hg^0 , Hg(I) e Hg(II) . No estado Hg^{++} e HgCl_2 , é uma molécula que possui um alto poder de estabelecer ligações covalentes e, em soluções aquosas, predomina a forma não dissociada HgCl_2 (Ribeiro, 1997).

A inserção de mercúrio inorgânico (Hg^{++}), formando SHgS é suficiente para modificar a estrutura das proteínas e, dependendo da região que ocorre, altera de forma irreversível a molécula (Watras e Huckabee, 1994).

Muitos organomercúrios são tóxicos, em particular devido a sua volatilidade, ($92,5^\circ\text{C}$ para 2MeHg e 100°C para MeHgCl). Os mesmos apresentam facilidade de atravessar a barreira sangue-cérebro, se concentrando no sistema nervoso central. No passado, cientistas inferiram o comportamento bioquímico do mercúrio comparando a acumulação de mercúrio em peixe com parâmetros químicos da água e outros fatores limnológicos. Problemas analíticos exageraram esta inferência, porque somente sedimentos e biotas continham concentração suficiente de mercúrio para detecção, considerando que a contaminação de amostras teria pouco efeito (Ribeiro, 1997).

Mercúrio Global

O mercúrio na atmosfera tende a ocorrer quase que exclusivamente como Hg^0 ; formas oxidadas [Hg(II) e metilmercúrio] constituem tipicamente menos do que 2% da concentração total no ar. Para o balanço de massa de mercúrio na atmosfera, tem sido estimado um valor entre 5.000 e 6.000 toneladas métricas. Fitzgerald (1986) estimou que aproximadamente 2.000 toneladas de mercúrio entram na atmosfera da superfície dos oceanos, idem para as fontes antropogênicas, e o resto da superfície terrestre. Ele estimou que os vulcões são as menores fontes. Em números, aproximadamente um terço da entrada de mercúrio na atmosfera vem de três principais fontes: oceanos, solo e ação antropogênica. As fontes antropogênicas são devidas a combustíveis fósseis, incineração de lixo e fusão de metais. Outras fontes antropogênicas de mercúrio são indústrias de bactericidas, fungicidas, tintas e indústrias de cloro-soda (Ribeiro, 1997).

A absorção de mercúrio pela célula

Ocorre através de membranas biológicas, e foi demonstrado que pH, concentração de cloro, potencial redox e outras características dos componentes de membrana (glicoproteínas, proteínas e cabeça polar dos lipídios) desempenham um papel importante no processo de bioacumulação do mercúrio (Ribeiro e Torres, 1995).

A passagem através da membrana pode ocorrer de forma passiva (espécies neutras como Hg^0 , HgCl_2 e CH_3HgCl). A endocitose pode contribuir para certos tipos celulares de forma indireta, pelo transporte de outras moléculas, como é o caso da absorção de aminoácidos no intestino. As membranas de outras organelas irão constituir um obstáculo ao mercúrio, dependendo da região intracelular que irá atuar.

Evidentemente que, chegando a nível citoplasmático, irá influenciar o metabolismo da célula (Hoffman et al., 1989).

Agentes quelantes

Os agentes quelantes são importantes na imobilização dos metais nos sedimentos. Os organismos vivos podem liberar uma variedade muito grande de moléculas orgânicas nos ambientes aquáticos; como exemplo as algas liberam polifenóis, sulfatos, polissacarídeos, aminoácidos, polipeptídeos e proteínas, que podem ligar-se a diferentes metais funcionando como agentes quelantes. As raízes de plantas aquáticas, liberam substâncias, incluindo os polissacarídeos, os quais são capazes de ligarem-se fortemente ao cádmio (Ribeiro, 1997).

Os riscos da exposição humana ao mercúrio

Os riscos ocorrem em função da constante contribuição antropogênica e da geoquímica do mercúrio, que já se encontra acumulado principalmente nos corpos d'água. Associado com a acidificação destes ecossistemas aquáticos, os riscos são maiores uma vez que isso favorece a sua metilação (Ribeiro, 1997).

A ação microbiana produz mercúrio orgânico, tóxico ao humano. Desse modo, a incorporação de metil mercúrio pelo homem afeta principalmente as populações que apresentam hábitos freqüentes no consumo de pescados provenientes de ambientes contaminados (Watras e Huckabee, 1994).

A FDA (US Food and Drug Administration) estabelece uma concentração máxima de mercúrio no músculo de peixes para o consumo humano em $1,0\mu\text{g Hg/g}$

(peso úmido), sendo que este valor não é de aceitação em outros países como o Canadá e alguns estados americanos, que utilizam $0,5\mu\text{g Hg/g}$. Em algumas populações humanas, os níveis de mercúrio encontrados no cabelo, urina e sangue foram extremamente altos, como nos acidentes de Minamata, com conseqüências graves para fetos e recém-nascidos (Ribeiro, 1997).

Com relação ao MeHg, dentre todos os organismos vivos, a espécie humana é a que apresenta a maior ineficiência na defesa contra o efeito tóxico desta molécula. O mais curioso é que o mercúrio tem grande afinidade pelo sistema nervoso central, mais especificamente pelas áreas corticais. O MeHg vai ser absorvido no intestino e apenas uma pequena parte é eliminada pela atividade da flora bacteriana. Na circulação, pode ser carregado para o cérebro, sem praticamente nenhuma barreira; para os rins, onde uma pequena parte é eliminada pela urina; para o cabelo onde é acumulado.

A baixa concentração de glutathione nas células nervosas favorece a ligação do MeHg com os grupos SH, principalmente nas proteínas chaves de desenvolvimento do cérebro, bem como afetando a despolimerização dos microtúbulos do citoesqueleto, estrutura fundamental na divisão e migração celular (Ribeiro, 1997).

OBJETIVO / JUSTIFICATIVA

O objetivo deste trabalho é a análise da cromatina de células de fígado e cérebro da espécie *Mimagoniates microlepis*, sob contaminação de HgCl_2 a $0,5\mu\text{g.litro}^{-1}$. Através da coloração de Feülgen, pode-se observar o DNA, cujos aldeídos desmascarados na hidrólise, reagem com reativo de Schiff. Desta forma, estudos comparativos entre indivíduos contaminados e controle podem fornecer dados dos efeitos causados pela contaminação sobre a organização e estrutura da cromatina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta

Um número de 50 exemplares de *Mimagoniates microlepis* (família Characidae, subfamília Glandulocaudinae) (figuras 1 e 2), entre machos e fêmeas, medindo em torno de 3,5 e 4,5 cm de comprimento, foram coletados no município de São José dos Pinhais, em um pequeno fluxo afluente do rio Pequeno, a trinta quilômetros de Curitiba, capital do estado do Paraná, Brasil. Inicialmente, os exemplares coletados foram colocados em recipiente de plástico de vinte litros contendo água retirada do próprio rio. O transporte entre o local de coleta e o laboratório durou aproximadamente quarenta minutos e a água não recebeu aeração.

Ao serem passados do recipiente para o aquário, este último continha água tratada de torneira em descanso por três dias para a evaporação de cloro, juntamente com um borbulhador em funcionamento.

Aclimatização

Por dez dias, os exemplares foram mantidos em um aquário (60 litros) com menos da metade de sua capacidade preenchida por água, sob temperatura que variava entre 15°C e 20°C; suas faces laterais vedadas com papel; o pH não foi verificado neste período, a água não foi trocada e a aeração foi mantida por dois borbulhadores.

O alimento fornecido foi vitormônio, produto de linha comercial que contém farinha de carne 57 %, sendo o restante farinha de peixe, farinha de rosca, germe de trigo, farinha de milho e farinha de soja. A alimentação foi fornecida diariamente, uma

vez por dia.

A seguir os peixes foram transferidos para seis aquários de vidro (3 litros cada), sendo dois para controle e quatro para a contaminação, contendo 4 exemplares cada. O aquário de 60 litros serviu como reservatório para armazenagem de indivíduos que poderiam ser utilizados para fins de metodologia de segurança. Cada aquário continha um borbulhador para a aeração (sem filtro) e um período de uma semana foi dado para que os exemplares pudessem se habituar à nova condição ambiental.

Os quatro aquários contaminados, foram colocados em uma capela de exaustão de gases, evitando que a volatilidade do mercúrio pudesse vir a contaminar o laboratório de análise.

Cada aquário funcionou como um sistema fechado coberto com plástico, que parcialmente não permitia a saída do mercúrio em seu estado de volatilização. O sistema permitia uma passagem para a entrada do tubo do borbulhador.

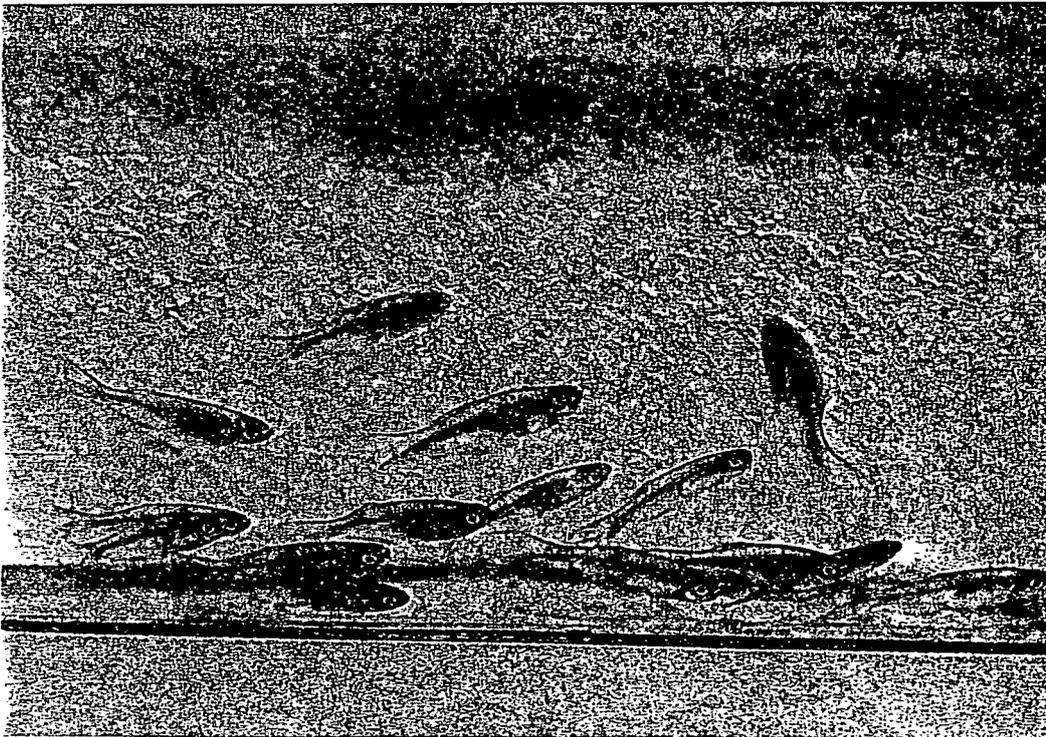
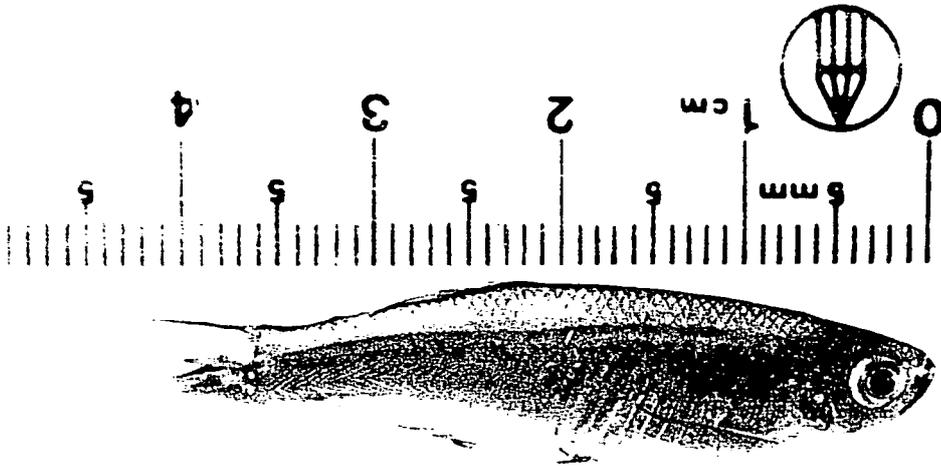
Contaminação

A contaminação foi de $0,5\mu\text{g.litro}^{-1}$ de HgCl para os quatro aquários. Cinco coletas foram realizadas nos períodos de 2, 4, 8, 24 e 48 horas.

Rede de captura para os aquários controle e contaminados foram individualizadas para evitar a contaminação do controle. O uso de luvas cirúrgicas auxiliaram na impossibilidade de contaminação do manipulador.

Cortes de secção

Após cada período de tratamento, 3 indivíduos foram sacrificados através de um corte transversal na região dorso anterior, no sentido de desconectar a medula espinhal do encéfalo. Desta forma pode-se inibir as atividades motoras para melhor manuseio (figura 3) .Um segundo corte longitudinal ventral, no sentido pôstero-anterior, com princípio na abertura da cloaca e terminando próximo a boca, expôs as vísceras para retirada dos órgãos principais para análise (figura 4).



Figuras 1 e 2. (1) Foto de *Mimagoniates microlepis* medindo aproximadamente 3,9 cm. (2) Exemplos em grupo, dentro do aquário de 60 litros.

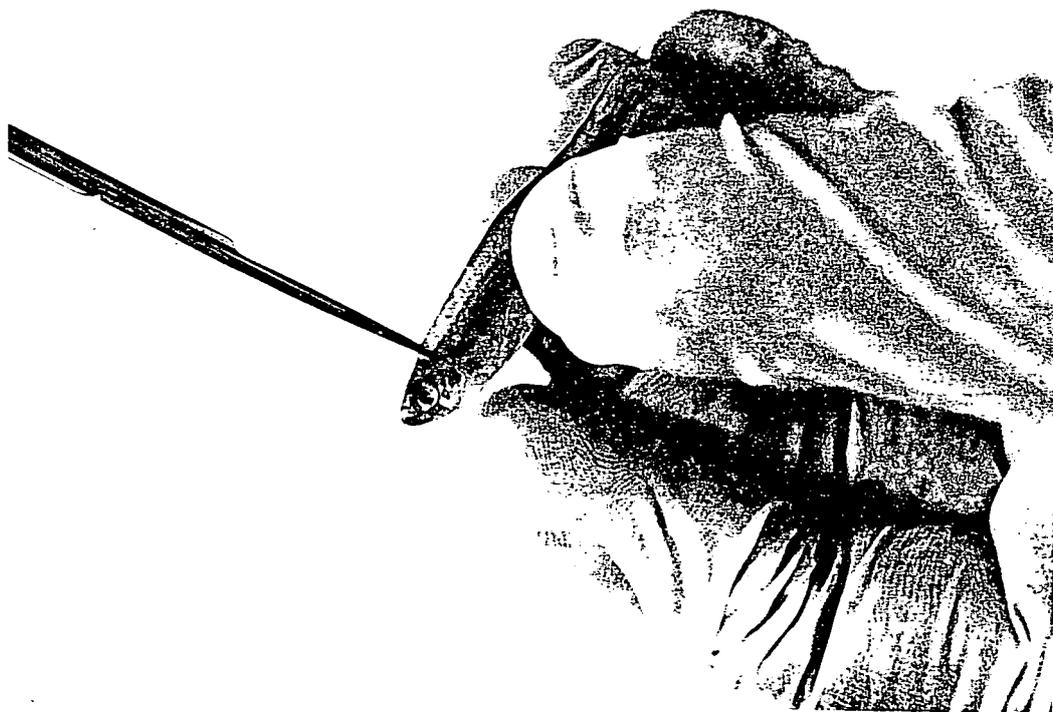


Figura 3. Foto do corpo de *Mimagoniates microlepis* demonstrando a região o qual foi efetuado o corte, para desconexão do encéfalo com a medula .



Figura 4. Foto demonstrando o ponto exato do corte na região ventral, para exposição e retirada dos órgãos.

Preparação das lâminas

Mantidos suspensos por pinça, fígado e cérebro retirados foram levemente encostados sobre a lâmina, afim de que somente os núcleos de suas células permanecessem sobre a superfície da lâmina (“imprint”). Um número de 6 lâminas por órgão foi feito para cada indivíduo.

Posteriormente, o material foi fixado em etanol-ácido acético (3:1, v/v) por um (1) minuto, lavado em álcool 70% (setenta por cento) por mais um (1) minuto.

Para reação de Feülgen foram efetuado os passos abaixo:

- Hidrólise - HCl 4,0N por 25 minutos a 25°C;
- Parada da hidrólise - HCl 0,1N gelado;
- Lâminas secadas;
- Coradas com reativo de Schiff por 40 minutos;
- 3 banhos seguidos de água sulfurosa (180 ml de H₂O destilada, 10 ml de metabissulfito de sódio a 10 %, 10 ml de HCl a 1N) (5 minutos cada);
- Desidratação com álcool a banhos seguidos de 70, 80 e 100% (3 vezes o último), por dois minutos cada;
- Imersão em xilol por 10 minutos;

As lâminas foram montadas com Polymount e cobertas por lamínula . As observações e as fotos dos núcleos foram realizadas em um Fotomicroscópio Axiophot Zeiss com objetiva de 63x e optovar 1.

Curva de hidrólise

Uma curva de hidrólise realizada com tempos de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 minutos (HCl 4,0N, 25°C), serviu como artifício importante para se evidenciar o tempo ótimo de ação do ácido sobre as purinas.

Observando-se os resultados, uma ordem por intensidade de coloração foi registrada com sinais positivos para nos mostrar a relação existente entre os diferentes tempos de hidrólise. Os dados estão demonstrados no gráfico 1.

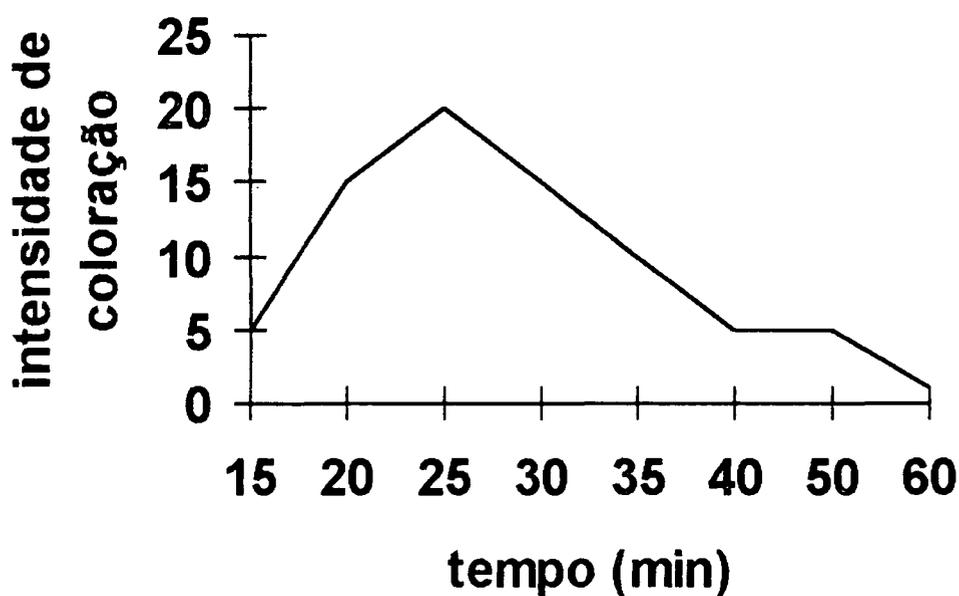


Gráfico 1. Gráfico demonstrando dados coletados da curva de hidrólise. Os diferentes tempos são demonstrados na linha horizontal e a intensidade de coloração na linha vertical. Sinais positivos foram atribuídos de acordo com o grau de intensidade da coloração do núcleo e graficamente substituídos pelos números: 5 (+); 10 (++); 15 (+++) E 20 (++++). Pode-se evidenciar que, para esta análise e este tipo de material, o pico de coloração se dá no tempo de 25 minutos de hidrólise em HCl 4,0 N a 25°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas primeiras vinte e quatro horas, os exemplares contaminados suportaram a concentração de $0.5\mu\text{g Hg. litro}^{-1}$, porém ocorreram mortes em tempos superiores, e não foi possível realizar a coleta prevista inicialmente de noventa e seis horas. Constatando-se a vulnerabilidade desta espécie à exposição aguda ao mercúrio.

Os núcleos das células de fígado retirados dos controles, apresentam uma cromatina de caráter homogêneo com grânulos irregularmente distribuídos. O nucléolo, representado por um campo claro (em resposta à remoção dos RNA's pela hidrólise), ocupa aproximadamente trinta por cento da região do nucleoplasma. Devido a ocorrência de um DNA aparentemente pouco empacotado, a hidrólise de 25 minutos foi a ideal para a dissociação das histonas, mas mesmo nestas condições, ocorreu pouca ligação do corante acarretando um baixo contraste do material (Figura 5).

Não há uma alteração aparente, ao nível estrutural, em tempos de duas e quatro horas após a contaminação (Figura 6). A partir do tempo de oito horas, a eucromatina se apresenta mais difusa, e sua região mais condensada restringe-se a manchas lineares, muitas vezes em grânulos dispostos em círculos (Figura 7); estas alterações podem estar indicando uma alteração do metabolismo celular, fazendo com que genes silentes passem a se expressar em resposta à situação de estresse a que a célula está submetida. A presença de hemácias em maior quantidade é visível neste tempo e pode estar refletindo um alto fluxo sanguíneo no órgão em resposta ao mercúrio, possivelmente devido a alteração no metabolismo. Esse resultado sugere que na função hepática de desintoxicação do organismo, o alto fluxo sanguíneo esteja ocorrendo em resposta a

tentativa de eliminar o mercúrio presente no mesmo.

Seguindo-se a observação dos contaminados nos tempos de vinte e quatro e quarenta e oito horas, um padrão de morfologia como descrito em oito horas repete-se nestes tempos, demonstrando uma estabilização na resposta do peixe ao estresse (Figura 8).

Para esta última observação, sugere-se que as mudanças estruturais da cromatina prosseguem até um limite de descondensação em resposta às alterações fisiológicas e aparentemente não se registram outras modificações. Propõe-se que é insuficiente a ação da síntese de novas proteínas que possam atenuar os efeitos causados pelo mercúrio, e por isso ocorrem mortes em tempos superiores a quarenta e oito horas de exposição.

Levando em consideração que experimentos laboratoriais não substituem toda a complexidade de um ambiente natural, os resultados obtidos por este experimento pela contaminação de *Mimagoniates microlepis*, sugerem o poder tóxico do mercúrio para esta espécie de peixe tropical, e vêm a corroborar com outros trabalhos realizados nesta área.

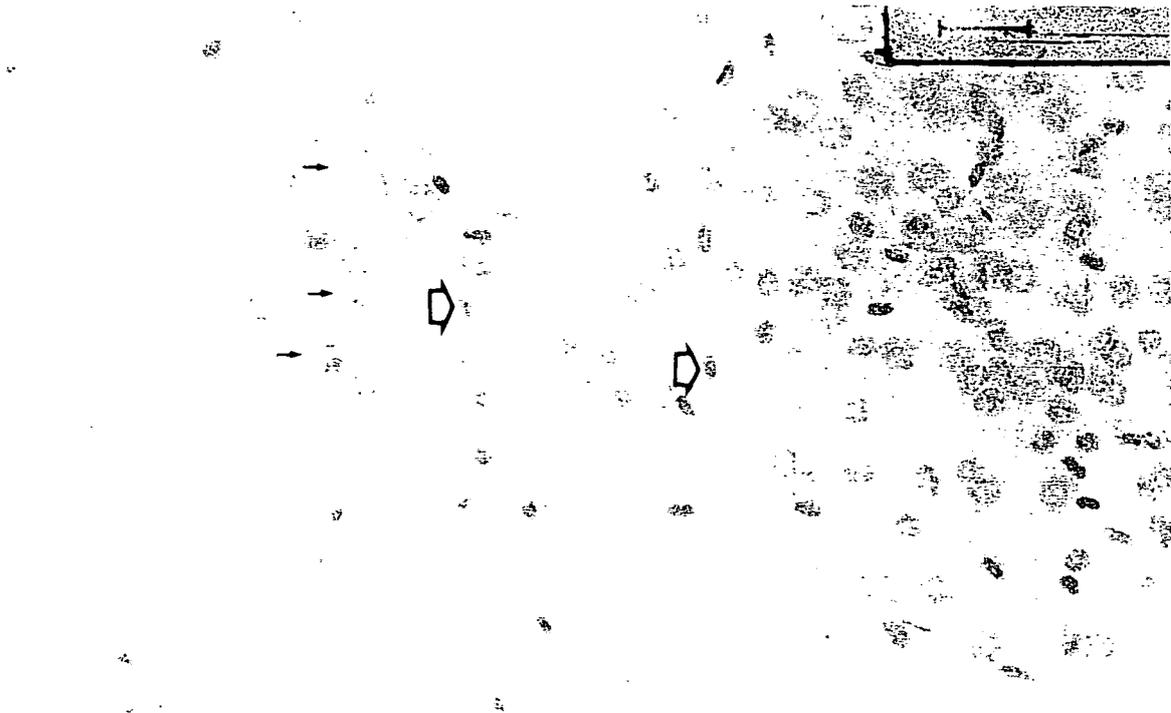


Figura 5. Núcleos de hepatócitos (→) de indivíduo controle. Nota-se a presença de grânulos de cromatina mais condensada irregularmente distribuídos e pouca quantidade de hemácias (◻). Barra = 15,9 μm (válida para as fotos seguintes).

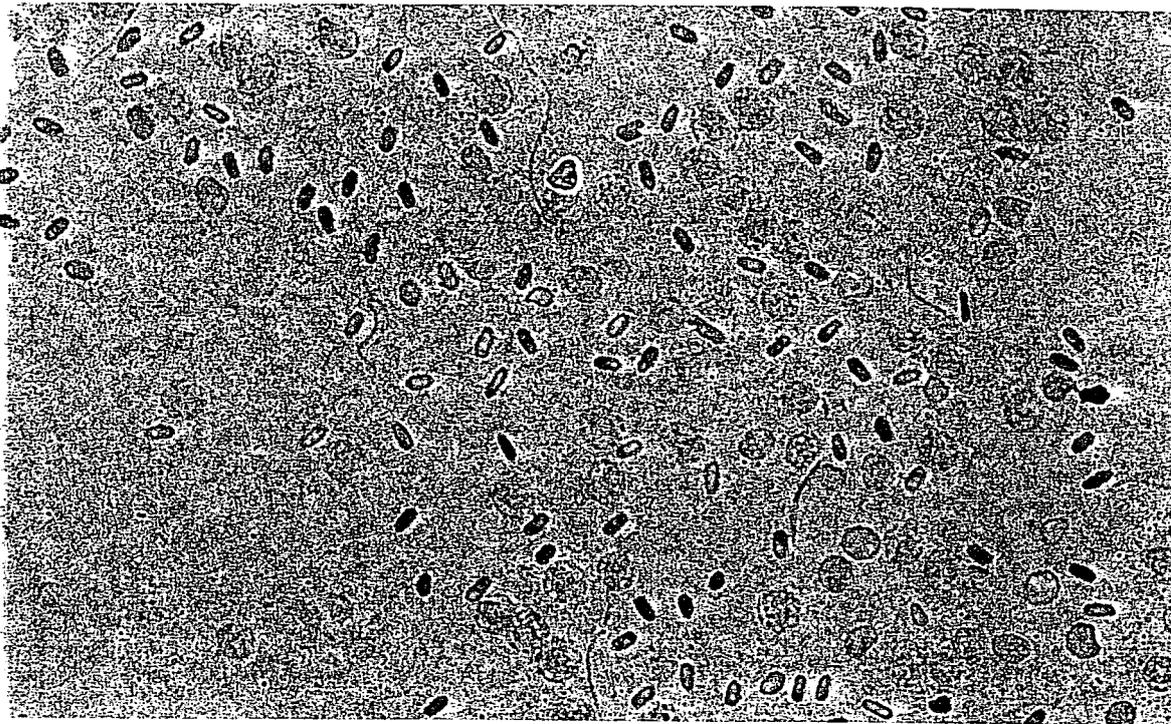


Figura 6. Os núcleos de hepatócitos de indivíduos contaminados por duas horas apresentam pouca diferença morfoestrutural em relação ao controle. Pode-se observar os grânulos presentes e hemácias em quantidade relativamente maior.

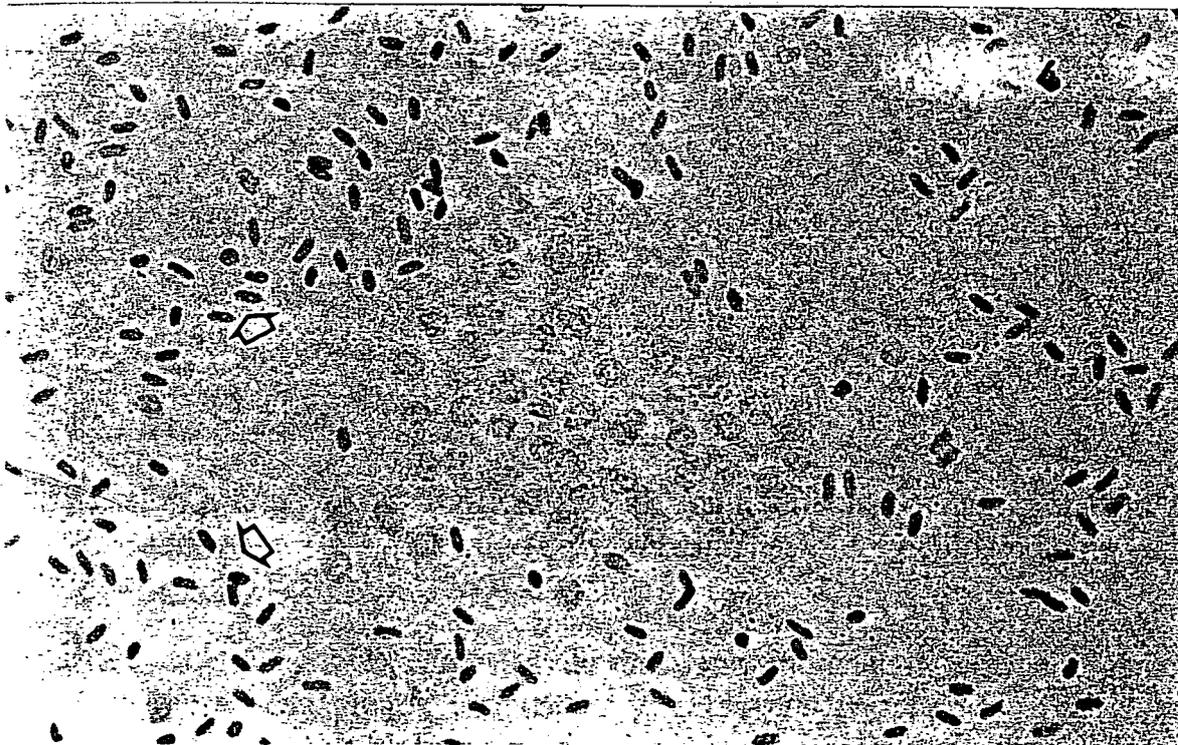


Figura 7. Núcleos de hepatócitos de exemplares contaminados por oito horas. Notar que a cromatina se torna mais difusa, os grânulos se tornam mais evidentes e com distribuição em círculo. Grande quantidade de hemácias podem ser observadas (setas).

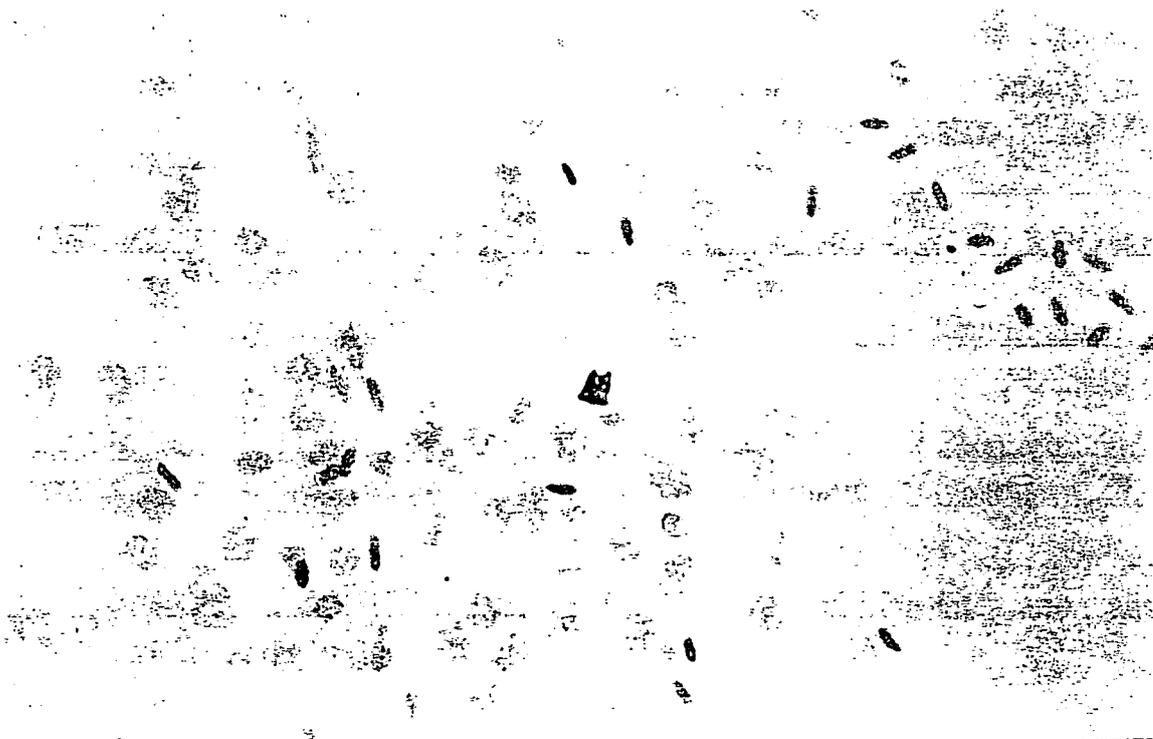


Figura 8. Núcleos de hepatócitos de exemplares contaminados por quarenta e oito horas. Comparando com os núcleos de contaminados por oito horas, verifica-se que poucas mudanças morfoestruturais na cromatina podem ser evidenciadas, mas há uma diminuição considerável na quantidade de hemácias.