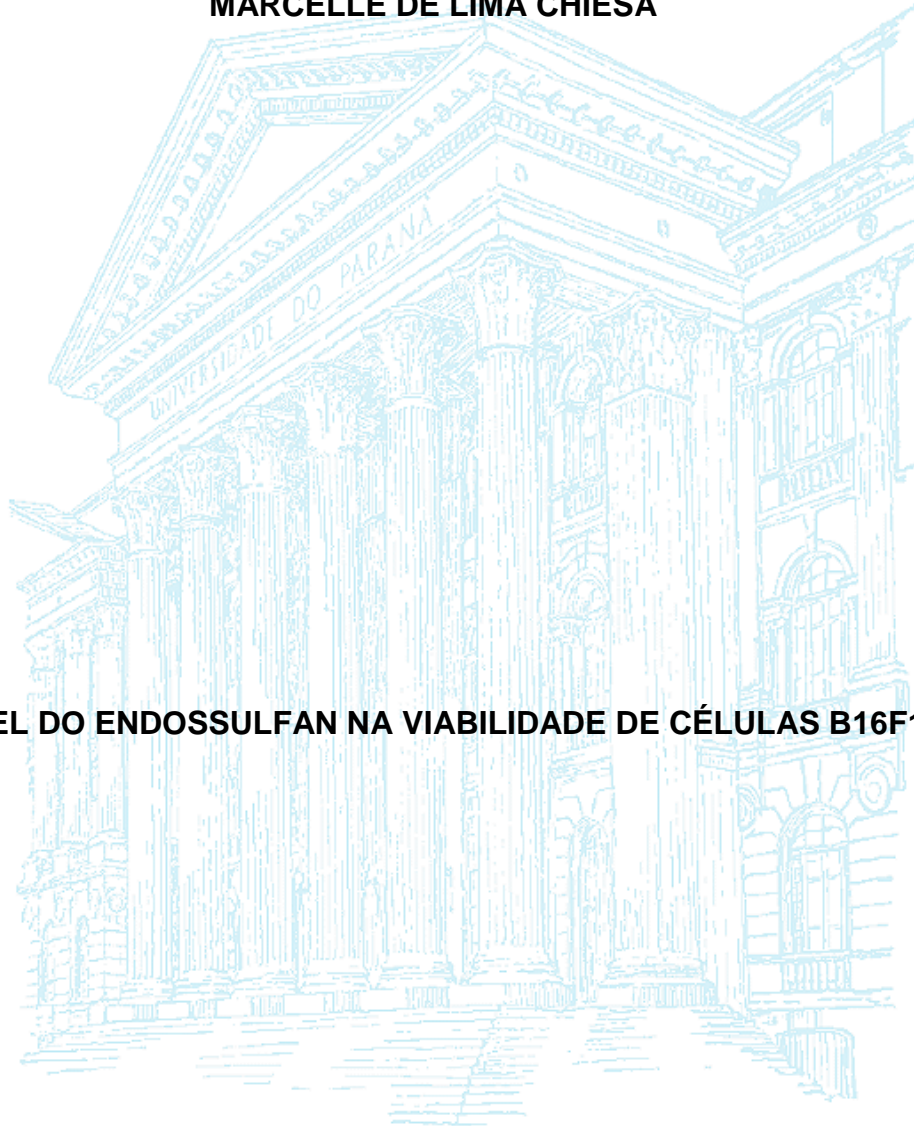


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARCELLE DE LIMA CHIESA



PAPEL DO ENDOSSULFAN NA VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10

CURITIBA

2014

MARCELLE DE LIMA CHIESA

PAPEL DO ENDOSSULFAN NA VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

Coorientadora: Prof^a Dr^a Célia Regina Cavichiolo Franco

**CURITIBA
2014**

TERMO DE APROVAÇÃO

MARCELLE DE LIMA CHIESA

PAPEL DO ENDOSSULFAN NA VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Paraná.

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Departamento de Biologia Celular, UFPR

Prof^a. Dr^a. Katya Naliwaiko
Departamento de Biologia Celular, UFPR

Ms^a. Stellee Marcela Petris Biscaia
Departamento de Biologia Celular, UFPR

Curitiba

2014

RESUMO

O câncer de pele é um dos tipos de câncer mais frequentes no Brasil, sendo o tipo não-melanoma o mais comum e o tipo melanoma o mais letal. Além das causas do câncer de pele relacionadas aos hábitos de vida do indivíduo, ao meio ambiente e à genética, alguns estudos também associam o aparecimento do melanoma com a exposição a alguns pesticidas. O endossulfan é um inseticida organoclorado que já foi relacionado com o surgimento de alguns tipos de câncer, porém não há na literatura sua relação com situações em que o câncer já está presente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se o endossulfan sulfato, metabólito do endossulfan, afeta a malignidade das células tumorais, o que poderia interferir com a progressão do melanoma. Para isso, foram realizados dois experimentos de viabilidade nas células B16F10: o Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e vermelho neutro (VN). Células da linhagem B16F10 (melanoma murino) foram expostas a seis concentrações diferentes de endossulfan sulfato (0,012 μM ; 0,12 μM ; 1,2 μM ; 12 μM ; 120 μM ; 1200 μM), selecionadas a partir de dados na literatura, e dois controles (PBS e DMSO) por 24 h. Para a análise dos resultados foi utilizado o teste estatístico ANOVA de uma via. Em ambos os ensaios, nenhuma das concentrações ocasionou diferença significativa na viabilidade em relação ao controle. Como perspectivas, ensaios de proliferação e atividade de transportadores envolvidos com efluxo de drogas deverão ser avaliados em investigações futuras.

Palavras-chave: B16F10. Endossulfan Sulfato. Melanoma. MTT. Vermelho Neutro

ABSTRACT

The most common form of cancer in Brazil is skin cancer. Of skin cancer types, non-melanoma is the most frequent whereas melanoma is the most lethal. Skin cancer is usually associated with human lifestyle, environment and genetics, but some studies have also associated melanoma's etiology with exposure to some pesticides. The relation of endosulfan, an organochlorine insecticide, and the etiology of some cancers is known, but there is no literature describing its relation with cancer prognosis. Therefore, the aim of the current study was to determine whether endosulfan sulfate, the main endosulfan metabolite, affects the malignancy of tumor cells and so interferes with the progression of melanoma. For this, B16F10 (murine melanoma) cells were exposed to six different concentrations of endosulfan sulfate (0,012 μM ; 0,12 μM ; 1,2 μM ; 12 μM ; 120 μM ; 1200 μM), that were based on tissue bioaccumulation data and two controls (PBS and DMSO), for 24 h. Two viability tests were utilized for this preliminary study, MTT and neutral red (NR). Endosulfan sulfate exposure had no effect cell viability. Future investigations will determine endosulfan sulfate effects on cell proliferation and activity of transporters involved in drug efflux.

Key words: B16F10. Endosulfan. Melanoma. MTT. Neutral Red

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS.....	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 A PELE	9
3.2 MELANOMA	10
3.3 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS.....	11
3.4 ENDOSSULFAN.....	13
3.4.1 CARACTERÍSTICAS DO ENDOSSULFAN	13
3.4.2 EFEITOS DO ENDOSSULFAN.....	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	16
4.2 VIABILIDADE CELULAR	17
4.2.2 VERMELHO NEUTRO	17
4.2.3 BROMETO DE 3-[4,5-DIMETIL-TIAZOL-2-IL]-2,5-DIFENILTETRAZÓLIO (MTT)	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

Tumor é um aumento de volume observado em uma região do organismo. Quando este aumento ocorre devido ao crescimento no número de células, dá-se o nome de neoplasia. As neoplasias podem ser benignas, as quais possuem células que se multiplicam mais lentamente e são mais semelhantes às originais; e as malignas, também denominadas de câncer, nas quais as células tendem a ser mais agressivas e podem migrar para outros tecidos. Dessa forma, os tumores benignos raramente podem ser considerados como um fator de risco à vida (INCA, 2014).

No Brasil, o câncer de pele é o mais frequente e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, sendo o melanoma um dos mais letais (INCA, 2014). Estes dados tornam-se preocupantes, haja vista que os melanócitos podem migrar para gânglios linfáticos e órgãos internos e assim formar metástases (SOUZA *et al.*, 2009). Em casos de metástase, a expectativa de vida dos pacientes é de até seis meses (GARBE, 2011).

O câncer pode ter várias etiologias, porém as causas geralmente estão relacionadas aos hábitos de vida do indivíduo, ao meio ambiente e à genética. Esses fatores podem interagir de várias formas, aumentando ou diminuindo a probabilidade do surgimento de tumores (INCA, 2014). Dentre os fatores de risco, a exposição ao Sol é a principal causa do surgimento do melanoma e também a de mais fácil prevenção (LAGES *et al.*, 2012). Porém, alguns estudos relacionam o aparecimento do melanoma com a exposição a alguns pesticidas. O endossulfan, por exemplo, foi descrito como um possível agente causador de alguns tipos de câncer dependentes de hormônio e a presença do receptor de estrógeno nos melanócitos reforça esta ideia (BEHRENS *et al.*, 2012).

Atualmente, os tratamentos para pessoas diagnosticadas com câncer de pele do tipo melanoma são a quimioterapia e a radioterapia. Porém, os pacientes podem não ser bem responsivos a estes tratamentos (GARBE, 2011; GRAY-SCHOPFER; WEELBROCK; MARAIS, 2007). Além disso, o tratamento do melanoma é caro, particularmente para os casos de câncer em estágio mais avançado (SOUZA *et al.*, 2009).

Contudo, o papel de poluentes sobre a sobrevida e eficiência do tratamento em indivíduos já acometidos pela doença tem sido negligenciada. Dessa maneira,

percebe-se a necessidade de verificar a influência do endossulfan sobre células de um melanoma já formado, uma vez que há muitos estudos relacionando-o com o aparecimento do melanoma, mas não há indícios sobre a influência deste pesticida na malignidade destas células.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se o endossulfan afeta a malignidade das células tumorais interferindo com a progressão do melanoma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS

- Verificar se o endossulfan afeta a viabilidade e o metabolismo celulares de células B16F10 através do ensaio do vermelho neutro;
- Verificar se o endossulfan afeta a viabilidade das células B16F10 através do ensaio MTT.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, funcionando como importante barreira e meio de comunicação com o meio exterior. O organismo é recoberto inteiramente por este órgão (FEITOSA, 2008). A área mais superficial da pele é a epiderme a qual é um tecido multiestratificado. Dentre as células presentes na epiderme, há os melanócitos e queratinócitos. Melanócitos são células dendríticas procedentes de células progenitoras da crista neural que migram para a pele durante o desenvolvimento embrionário (FORTES *et al.*, 2007).

Os melanócitos e queratinócitos estão presentes, predominantemente, nos olhos e na pele, sendo responsáveis pela coloração destes locais. Na pele, os melanócitos residem na camada basal da epiderme (FIGURA 1). A quantidade de melanócitos na epiderme tem grande variação no organismo, tendo sua maior densidade nas regiões da cabeça e do antebraço (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

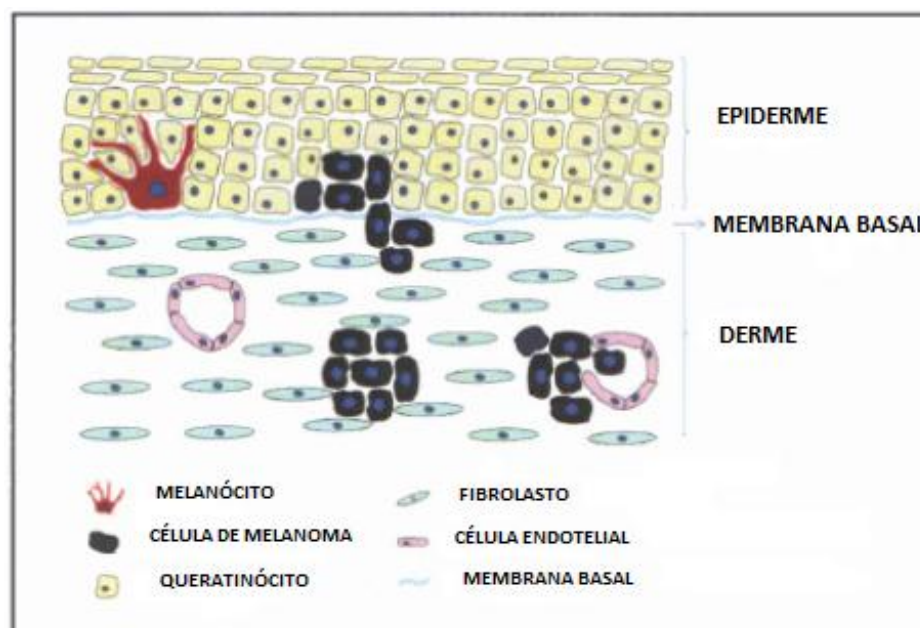


Figura 1. Figura representativa das células epiteliais. Fonte: Adaptada de HAASS, HERLYN, 2005.

Os melanócitos possuem organelas denominadas melanossomos, responsáveis pela síntese e deposição de melanina. Dentre suas principais funções, pode-se citar a coloração da epiderme, a qual é responsável por sua proteção; e a participação nos processos inflamatórios. Estas células têm como função principal a síntese de melanina que é transferida para os queratinócitos. A pigmentação da pele ocorre de duas maneiras: decorrente de informações genéticas, sem influência de fatores externos; e a pigmentação facultativa, a qual ocorre por influência de vários fatores, como a radiação UV, desequilíbrios hormonais e processos inflamatórios (FEITOSA, 2008).

3.2 MELANOMA

O câncer de pele pode ser caracterizado pelo crescimento descontrolado das células epiteliais. As neoplasias cutâneas são classificadas em melanoma e não melanoma, sendo o melanoma uma forma maligna do câncer (CAMPOS *et al.*, 2011). Existem algumas características importantes que podem diferenciar o câncer de pele benigno do melanoma (Figura 2).

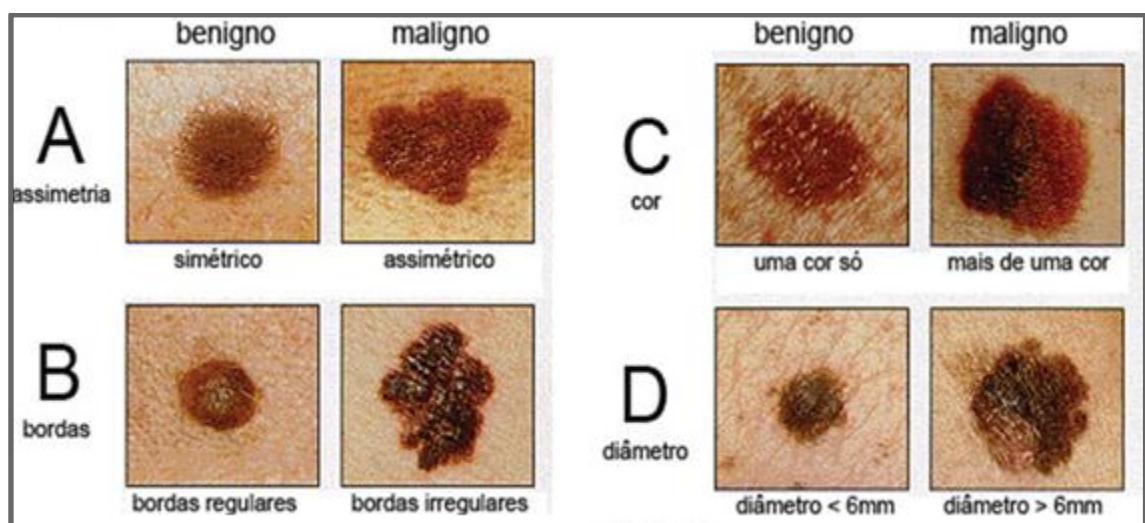


Figura 2. Características do câncer de pele benigno e maligno. Fonte: <http://www.saudemedicina.com/melanoma-cancer-de-pele-maligno-benigno/>

O melanoma corresponde ao estágio final da carcinogênese melanocítica que se origina da transformação de melanócitos em células com capacidade proliferativa e de invasão aumentadas. A localização do melanoma pode variar levemente entre mulheres e homens. Nas mulheres, o melanoma normalmente se desenvolve nas extremidades, mais comumente nos membros inferiores, enquanto que nos homens, o melanoma é mais encontrado na área entre os ombros e quadris. Já em ambos os sexos, o melanoma pode aparecer nas palmas das mãos ou solas dos pés e unhas (VOLKOVOVA *et al.*, 2012).

Alguns estímulos externos podem induzir a proliferação dos melanócitos. Em indivíduos expostos à radiação solar, por exemplo, os queratinócitos aumentam a secreção de fatores que regulam a sobrevivência dos melanócitos. Isto promove a diferenciação, proliferação e o aumento da produção de melanina. Assim, pode-se perceber que os melanócitos têm um papel fundamental na proteção contra danos causados por radiação solar na epiderme e, conseqüentemente, prevenindo o surgimento do câncer de pele (SOUZA *et al.*, 2004).

Os principais fatores que aumentam o risco do melanoma cutâneo são: características individuais, como o histórico familiar, número de nevos típicos e atípicos (manchas marrons características ou não do melanoma), cor da pele, incapacidade de bronzeamento e lesões de câncer de pele não melanoma; exposição à radiação ultravioleta, podendo ser tanto a exposição ao sol como câmara de bronzeamento; doenças imunossupressoras e; exposição a substâncias cancerígenas (FORTES *et al.*, 2007).

3.3 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

Os pesticidas organoclorados são substâncias lipofílicas e ricas em cloro, que acumulam no tecido adiposo e permanecem por anos no ambiente. Devido a esta característica de permanência, estas substâncias estão incluídas dentro do grupo dos poluentes organopersistentes, POPs (BEHRENS *et al.*, 2012).

Alguns estudos relacionam o aumento do risco de melanoma com o trabalho na agricultura (GALLAGHER *et al.*, 2011). Porém, ainda não está claro se esta

predisposição ocorre pela exposição ao Sol, aos pesticidas ou ainda à interação de ambos (DENNIS *et al.*, 2010). Estudos recentes levantaram a hipótese de que o risco de melanoma pode não ser apenas devido à exposição ao Sol, mas também pelas diferenças na densidade de nevos. As bifenilas policloradas (PCBs), por exemplo, estão associadas com essa capacidade de aumentar a densidade de nevos melanocíticos (GALLAGHER *et al.*, 2011). Nesta mesma linha, alguns pesquisadores perceberam que pessoas que trabalhavam expostas a pesticidas eram mais suscetíveis ao melanoma uveal (BEHRENS *et al.*, 2012).

Segundo Fortes *et al.* (2007), o controle de pragas não está restrito à agricultura, uma vez que pesticidas também são utilizados em ambientes domésticos. Estudos epidemiológicos nos Estados Unidos e na Europa estimam que cerca de 80% das famílias usam pesticidas em casa ou em ambientes ao redor da residência. Dessa maneira, a exposição ao pesticida residencial pode ser um importante fator de risco para melanoma cutâneo (FORTES *et al.*, 2007).

Outro fator muito importante que evidencia que os melanócitos são alvo dos pesticidas é que, embriologicamente, a célula precursora dos melanócitos, o melanoblasto, é uma célula nervosa diferenciada. Considerando que o alvo específico da maioria dos inseticidas é o sistema nervoso, há uma hipótese de que inseticidas possam afetar a função dos melanócitos (FORTES *et al.*, 2007).

Com base em todas as evidências já citadas, a maior parte dos artigos publicados na literatura relaciona o aparecimento do melanoma com a exposição ao Sol. Porém, Dennis *et al.*, (2010) sugerem que mais pesquisas são necessárias sobre agentes químicos que podem aumentar o risco deste tipo de câncer (DENNIS *et al.*, 2010).

3.4 ENDOSSULFAN

3.4.1 Características do Endossulfan

O endossulfan é um inseticida organoclorado que é encontrado no ambiente na forma dos isômeros α -endossulfan e β -endossulfan; e seus metabólitos são o endossulfan sulfato e o endossulfan-diol. Esse pesticida é largamente produzido desde 1950 (BECKER *et al.*, 2011), sendo muito utilizado para o controle de insetos em algumas culturas, como por exemplo, de frutas, café, legumes, arroz, milho, algodão e chá (BRINATI, 2011). Por este motivo, está presente no mundo todo, em concentrações elevadas nos ambientes com clima tropical e em mais baixas concentrações nos ambientes polares (BECKER *et al.*, 2011). Suas características individuais são o alto peso molecular e a baixa hidrossolubilidade. Dessa maneira, são bioacumuláveis no tecido adiposo e na biota, sofrendo também um acúmulo ao longo da cadeia trófica, a chamada biomagnificação (BALLESTEROS *et al.*, 2011). Além destes fatores, o endossulfan é considerado, de acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, como extremamente tóxico e de alta persistência, sendo incluído, pela convenção de Estocolmo, na lista dos pesticidas organopersistentes (POPs) (BALLESTEROS *et al.*, 2011; BECKER *et al.*, 2011; BRINATI, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1984), o endossulfan foi classificado como um material moderadamente perigoso e concentrações acima de $0,22 \mu\text{g.l}^{-1}$ em exposição aguda e $0,056 \mu\text{g.l}^{-1}$ em exposição crônica têm grande impacto para organismos aquáticos (BALLESTEROS *et al.*, 2011).

Além de ser utilizado para vários tipos de culturas, a ampla utilização do endossulfan pode também ser explicada pelo seu baixo custo, grande eficácia e por ser um produto extremamente viável (RAU *et al.*, 2012).

Contudo, ainda que em 2010 tenha sido publicada a Resolução RDC nº 28, de 9 de agosto de 2010, determinando o cancelamento da comercialização de todos os produtos formulados à base de endossulfan a partir do dia 31 de julho de 2013, fica evidente a necessidade de estudar este pesticida em virtude de suas

características, já citadas, de bioacumulação e biomagnificação (BRASIL, 2010). Além disso, esta substância permanecerá no ambiente por muitos anos, além de continuar sendo comercializada em muitos outros países. Nos Estados Unidos, por exemplo, o endossulfan é um dos pesticidas organoclorados mais comuns presentes na atmosfera e solo (SIDDIQUE *et al.*, 2003; SHEN *et al.*, 2005; WEBER *et al.*, 2010).

3.4.2 Efeitos do Endossulfan

Quando ocorre o contato com o endossulfan, sua absorção e distribuição pelo corpo são fáceis e rápidas (BALLESTEROS *et al.*, 2011).

A exposição pré-natal ao endossulfan foi relacionada com a diminuição dos níveis de catecolaminas no sistema nervoso (CERRILO *et al.*, 2005; LAFUENTE; PEREIRO, 2013). Ele também está relacionado com a inibição do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA). Este neurotransmissor é importante porque causa um efeito inibitório no sistema nervoso central. Dessa forma, o endossulfan pode causar um efeito de superestimulação do tecido nervoso. Além disso, um estudo feito por BRINATI mostrou que, além de efeitos neurotóxicos já mencionados, o endossulfan, nas concentrações recomendadas pelo fabricante, pode interferir nas concentrações plasmáticas dos carboidratos, hormônios, lipídios e proteínas (BRINATI, 2011).

No sistema endócrino, o endossulfan também já foi descrito como desregulador. Alguns estudos demonstraram que o pesticida está relacionado com a diminuição nos hormônios sexuais, como testosterona, LH e FSH (SAIYED *et al.*, 2003). Por causa disso, percebeu-se que o endossulfan também está relacionado com a degeneração dos testículos e túbulos seminíferos em ratos, influenciando, então, na espermatogênese (SINGH *et al.*, 2011).

Além desses efeitos, o endossulfan já foi descrito como agente causador de tumor, sendo capaz de induzir linfossarcomas e neoplasias do sistema reprodutivo em ratos (REUBER, 1981). Além disso, há relato de crianças com neoplasias hematológicas apresentando concentrações de endossulfan elevadas na medula óssea (RAU *et al.*, 2012).

Além de todos os fatores já citados, há evidência forte de interferência do endossulfan sobre os melanócitos em virtude deste ser um desregulador endócrino, pois há receptores de estrógeno, progesterona e estradiol nos melanócitos. Assim, o endossulfan poderia influenciar no aparecimento de alguns tipos de câncer dependentes de estrógeno, como o melanoma (BEHRENS *et al.*, 2012; VOLKOVOVA *et al.*, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Para o presente projeto, foram empregadas células de linhagem de melanoma murino B16-F10. Estas células foram cultivadas em garrafas com meio DMEM, 10% de Soro Fetal Bovino, 4500 mg.L⁻¹ de glicose, 1 U.mL⁻¹ de penicilina e 1 µg.mL⁻¹ de estreptomicina, e mantidas na incubadora com 5% de CO₂ até a confluência de 70%. Após expansão, as células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços, como mostra a figura 3 e expostas ao endossulfan sulfato pelo período de 24 h.

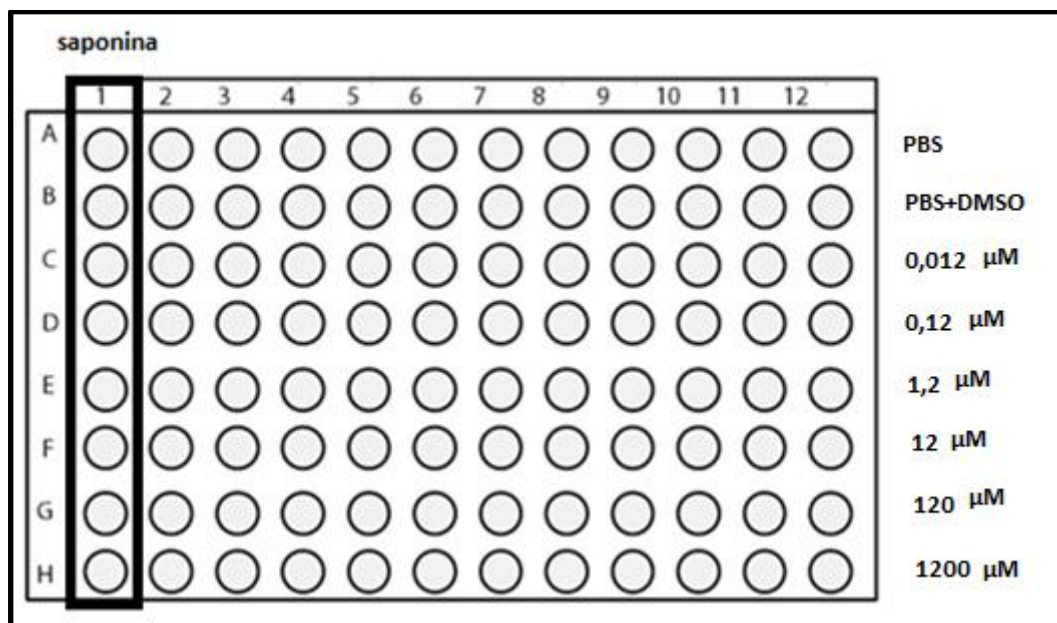


Figura 3. Figura representativa da disposição das concentrações utilizadas na placa de 96 poços. Fonte: adaptada de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842004000100006

Para que as células fossem plaqueadas, foi realizada a contagem das células na câmara de *Neubauer* a fim de saber aproximadamente o número de células na garrafa. Com isso, pode-se calcular o volume necessário deste meio com células para que houvesse 8000 células por poço e 32000 células ao final da exposição.

A exposição ocorreu através da substituição do meio de cultura por novo meio contendo endossulfan sulfato (solubilizado em dimetilsulfóxido, DMSO) em seis diferentes concentrações. Como controles, as células foram expostas ao meio acrescido de 1,5% de DMSO e PBS. As concentrações utilizadas foram de 0,012 μM ; 0,12 μM ; 1,2 μM ; 12 μM ; 120 μM ; 1200 μM , estabelecidas a partir de dados já publicados relacionados com a ingestão diária permitida e as concentrações encontradas em diversos tecidos do organismo (RASTOGI *et al.*, 2014).

4.2 VIABILIDADE CELULAR

Para visualizar o potencial citotóxico do endossulfan sulfato é necessário verificar se, após a exposição, as células continuam viáveis. Para isso, existem testes de viabilidade celular que foram aplicados nas células B16-F10, como o teste do vermelho neutro e MTT.

4.2.2 Vermelho Neutro

O teste do vermelho neutro (NR) baseia-se na capacidade de os lisossomos das células viáveis internalizarem o NR. Esta substância é um corante catiônico fraco que penetra rapidamente nas células através das membranas celulares por difusão simples e, ao entrar em contato com a matriz ácida dos endossomos e lisossomos, torna-se ionizada, sendo assim aprisionada. Mudanças na superfície celular ou na membrana lisossômica, causadas por xenobióticos, por exemplo, resultam na diminuição da retenção do NR (ANDRADE, 2007).

Para a realização desse teste, uma hora antes do final da exposição foi adicionado 100 μl de saponina em um poço de cada grupo como controle positivo. Assim, após o tempo de exposição ao endossulfan sulfato foi trocado o meio de cultura por outro contendo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de NR. Após a incubação por 3h, as placas foram lavadas três vezes com solução de formol (0,5% em água) e cloreto de cálcio

(0,1%). Para a retirada do corante, foi utilizada 300 µl de uma solução contendo ácido acético (1%) e etanol (50%). Após 15 min, o conteúdo dos poços foi homogeneizado, aguardando-se o material não solúvel sedimentar por 5 min. Então, foi retirado 200 µl do sobrenadante da solução e transferido a uma microplaca para leitura no espectrofotômetro a 540 nm (LIEBEL *et al.*, 2011). A quantidade de corante incorporado às células é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta (células viáveis) e isto pode ser determinado por meio de quantificação da absorbância (ANDRADE, 2007).

4.2.3 Brometo de 3-[4,5-Dimetil-Tiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazólio (MTT)

MTT é um sal de tetrazólio utilizado para medir a atividade metabólica de células viáveis. Este método consiste na redução do MTT a formazano pela enzima succinato desidrogenase na mitocôndria. Esta enzima está presente e funcional nas células que possuem sua mitocôndria intacta. Uma vez ocorrida a redução, a coloração do meio muda de amarelo (MTT) para lilás (formazano). Esta mudança de colocação pode ser quantificada através do espectrofotômetro. Portanto, o formazano será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, conseqüentemente, à viabilidade celular. Em outras palavras, quanto maior a quantidade de formazano, maior viabilidade das células (ANDRADE, 2007).

Assim como para o ensaio de vermelho neutro, foi adicionado 100 µl de saponina 1 hora antes da adição do MTT em um poço de cada grupo como o controle negativo. Para este ensaio, foi acrescido 20 µl de MTT, da solução estoque a 0,5 mg.ml⁻¹, em cada poço da placa 2 horas antes do final da exposição ao endossulfan sulfato. Após incubado por 2 horas, os poços foram lavados com PBS, duas vezes, e adicionados 100 µl de DMSO para solubilizar os cristais de formazano e mais 100 µl PBS para leitura imediata no espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para análise da viabilidade celular sob exposição ao endossulfan, foram realizados ensaios MTT em seis concentrações diferentes (0,012 μM ; 0,12 μM ; 1,2 μM ; 12 μM ; 120 μM ; 1200 μM). Todas as concentrações foram comparadas com o controle DMSO, que continha meio com suplementações + DMSO + PBS, uma vez que o endossulfan foi preparado em ambos antes de ser adicionado ao meio de cultura nos grupos expostos. Apesar de aparentar haver uma leve redução na viabilidade das células expostas às diferentes concentrações, em 24 h, como mostra na figura 3, não houve diferença estatisticamente significativa. Em outras palavras, nenhuma concentração de endossulfan influenciou na viabilidade das células B16F10.

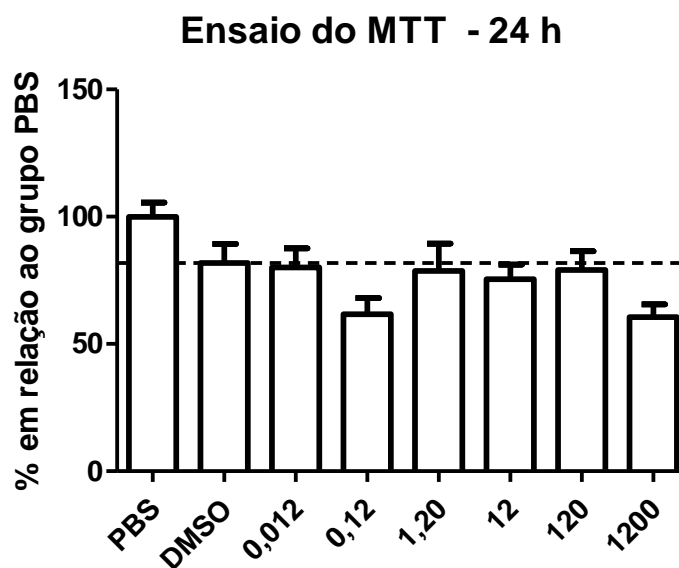


Figura 4. Viabilidade Celular determinada pelo método do MTT. ANOVA de uma via.

Existem muitos estudos que relacionam a influência do endossulfan sulfato no cultivo de diferentes células. Contudo, não há na literatura dados que relacionam este pesticida com células de melanoma, como a B16F10.

Estudos com linhagem de células cancerígenas do fígado, HepG2, realizadas por Pyere *et al.* (2014), demonstraram que concentrações entre 50 μM e 200 μM aos isômeros de endossulfan (α -endossulfan e β -endossulfan) causaram uma redução na viabilidade das células após 24 h de exposição (PYERE *et al.*, 2014). Outro estudo semelhante, realizado por Sohn *et al.* (2004), com células HepG2 e com células de câncer cervical, HeLa, mostrou que a viabilidade destas células também reduz em concentrações de 50 μM a 200 μM de endossulfan. Porém, quando comparadas as duas, pela estimativa da IC_{50} (concentração necessária para matar 50% das células), observou-se que a HepG2 é mais sensível ao endossulfan do que as células HeLa com o valor de 49,37 μM e 86 μM , respectivamente (SOHN *et al.*, 2004).

Já as células HepaRG, similares à HepG2, quando expostas a concentrações de endossulfan de 5 μM a 500 μM durante 24 h, tem suas atividades reduzidas com 100 a 200 μM (SAVARY *et al.*, 2014).

Porém, segundo Rastogi e colaboradores (2014), células de sertolli de ratos *wistar* têm sua viabilidade diminuída quando expostas aos isômeros α -endossulfan e β -endossulfan sob uma concentração de 40 μM por 72 h, o que não ocorre em outras concentrações como 2 e 20 μM (RASTOGI *et al.*, 2014).

Outra análise de viabilidade celular realizada neste estudo foi o ensaio do vermelho neutro. Assim como o ensaio MTT, foram usadas seis diferentes concentrações e também comparadas com o controle DMSO.

De forma semelhante aos resultados do MTT, nenhuma das concentrações utilizadas, no período de 24 h de exposição, levou à redução da viabilidade das células, como demonstrado na figura 5.

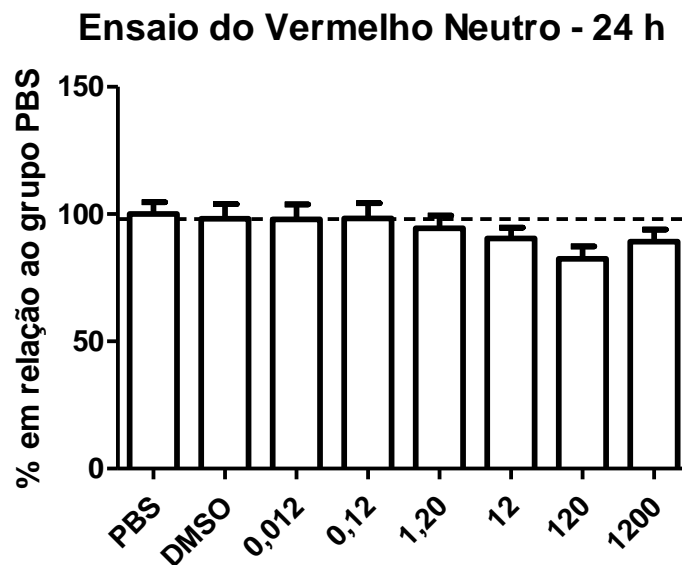


Figura 5: Viabilidade Celular determinada pelo método do vermelho neutro. ANOVA de uma via.

Outros trabalhos também utilizaram a técnica de vermelho neutro para analisar a viabilidade de diferentes células. Um estudo, realizado por Song e colaboradores (2012), avaliou a citotoxicidade do α -endossulfan e β -endossulfan em células HepG2 em concentrações que variavam de 1 μ M a 100 μ M durante o período de 24 h. Com esses resultados, percebeu que a citotoxicidade deste pesticida é concentração-dependente. Em outras palavras, quanto maior as concentrações de endossulfan sulfato, maior a citotoxicidade (SONG *et al.*, 2012).

Relacionando os resultados de ambos os ensaios nas células B16F10, apresentados neste trabalho, com os resultados dos mesmos ensaios em células diferentes, percebe-se que em concentrações muito menores de endossulfan diversas células já apresentam uma redução na viabilidade celular, ao contrário do que ocorre na B16F10. As concentrações utilizadas neste trabalho de 0,012 μ M; 0,12 μ M; 1,2 μ M; 12 μ M; 120 μ M; 1200 μ M; podem ser comparadas com os outros já citados, uma vez que abrange todas as concentrações dos outros estudos.

Uma possível explicação desta diferença significativa nos resultados da célula B16F10 para as outras células pode ser pelo fato de que ao contrário deste, outros estudos não utilizaram o endossulfan sulfato, mas os isômeros do pesticida parental endossulfan. Isto poderia modificar os resultados apresentados, pois apesar de os isômeros α - endossulfan e β -endossulfan serem menos persistentes que o

endossulfan sulfato, estudos com peixes demonstraram que há maior toxicidade deste metabólito em relação aos isômeros (WEBER *et al.*, 2010).

Outra explicação que poderia justificar essa diferença nos resultados pode ser as características das próprias células B16F10. Fazendo uma analogia com o melanoma, por este tipo de câncer ser um dos mais letais e menos responsivos a quimioterápicos, há uma maior resistência destas células em relação aos xenobióticos. Portanto, a célula B16F10 pode ter um sistema de defesa mais robusto do que o das outras células que são mais suscetíveis ao endossulfan. Além disso, como o endossulfan é metabolizado no fígado e a principal via de exposição é a trófica, as demais células do organismo devem entrar em contato com o endossulfan sulfato e não com o composto parental (SONG *et al.*, 2012).

Em relação a outros ensaios, há na literatura estudos que sugerem que os isômeros α - endossulfan e β -endossulfan pesticida podem causar a produção de espécies reativas de oxigênio e, assim, promover danos nas células HepG2 e HeLa (SOHN *et al.*, 2004). Ainda nessa mesma linha, segundo Rastogi e colaboradores (2014), este pesticida pode causar morte nas células de Sertolli devido ao dano oxidativo e a consequente ativação da via intrínseca da morte celular. Com isso, o endossulfan pode influenciar na qualidade dos gametas masculinos (RASTOGI *et al.*, 2014). Há também estudos que relacionam a exposição ao endossulfan à danos genéticos. Segundo Lu e colaboradores, (2000) a exposição a este pesticida já apresentava o endossulfan como um agente genotóxico para as células HepG2 (LU *et al.*, 2000).

Portanto, fica evidente a necessidade de serem realizados outros ensaios com o endossulfan sulfato nas células B16F10, uma vez que os já realizados utilizaram os isômeros α - endossulfan e β -endossulfan e não o endossulfan sulfato como o desse estudo. Logo, como perspectivas futuras podem ser realizados os ensaios de proliferação e atividade de transportadores envolvidos com efluxo de drogas.

6 CONCLUSÃO

O endossulfan sulfato, nas concentrações de 0,012 μM ; 0,12 μM ; 1,2 μM ; 12 μM ; 120 μM ; 1200 μM , não afeta a viabilidade celular das células B16F10.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. S. B. **Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células Vero**. 65f. Porto, 2007. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia) - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.

BALLESTEROS, M. L.; GONZALEZ, M.; WUNDERLIN, D. A.; BISTONI, M. A.; MIGLIORANZA, K. S. B. Uptake , tissue distribution and metabolism of the insecticide endosulfan in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae , Cyprinodontiformes). **Environmental Pollution**, v. 159, n. 6, p. 1709–1714, 2011.

BECKER, L.; SCHERINGER, M.; SCHENKER, U.; HUNGERBÜHLER, K. Assessment of the environmental persistence and long-range transport of endosulfan. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 6, p. 1737–1743, 2011.

BEHRENS, T.; LYNGE, E.; CREE, I.; LUTZ, J. M.; ERIKSSON, M.; GUÉNEL, P.; MERLETTI, F.; VARELA, M. M. S.; AFONSO, N.; STENGREVICS, A.; FÉVOTTE, J.; SABROE, S.; LLOPIS-GONZÁLEZ, A.; GORINI, G.; HARDELL, L.; STANG, A.; AHRENS, W. Pesticide exposure in farming and forestry and the risk of uveal melanoma. **Cancer Causes Control**, v. 23, n. 1, p. 141–151, 2012.

BRASIL. **Resolução n. 3.726, de 9 de agosto de 2010**. Regulamento Técnico para o Ingrediente Ativo Endossulfam em Decorrencia da Reavaliação Toxicológica. Diário Oficial da União, nº 156, de 16 de agosto de 2010, Seção 1. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4af12d80474591dd9a38de3fbc4c6735/Decis%C3%A3o.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 07/05/2014

BRINATI, A. **Efeitos toxicológicos do inseticida endosulfan sobre o metabolismo de morcegos frugívoros *artibeus lituratus* e análise do bioacúmulo no tecido adiposo e hepático**. 39 f. Viçosa, 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa.

CAMPOS, E.C.R.; SIMÕES, J.C.; KAMEI, D.J.; SANTOS, F.M.R.; PINHEIRO, E.B. A., BALDISSERA, R.L. Análise do perfil epidemiológico, clínico e patológico de pacientes portadores de câncer de pele não melanoma tratados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. **Rev. Med. Res**, v. 13, n. 4, p. 251- 260, 2011.

CASTILHO, L. R. Cultivo de células animais. Rio de Janeiro: Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares, 2002 (PEQ/COPPE/UFRJ. Projeto 10141). Projeto em andamento.

CERRILO, I.; GRANADA, A.; ESPINOSA, M. J. L.; OLMO, B.; JIMENEZ, M.; CANO, A.; OLEA, N.; SERRANO, M. F. O. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta. **Environmental Research**, v. 98, p. 233–239, 2005.

DENNIS, L. K.; LYNCH, C. F.; SANDLER, D. P.; ALAVANJA, M. C. R. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 6, p. 812–7, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2898858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29/3/2014.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a Arte do Diagnóstico**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008

FERREIRA, M.P.P. **Efeito da Laserterapia de Baixa Potência Sobre a Viabilidade de Células Musculares**. 21f. São Paulo, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) - Universidade Nove de Julho.

FORTES, C.; MASTROENI, S.; MELCHI, F.; PILLA, M. A.; ALOTTO, M.; ANTONELLI, G.; CAMAIONE, D.; BOLLI, S.; LUCHETTI, E.; PASQUINI, P. The association between residential pesticide use and cutaneous melanoma. **European journal of cancer**, v. 43, n. 6, p. 1066–75, 2007.

GALLAGHER, R. P.; MACARTHUR, A. C.; LEE, T. K.; WEBER, J. P.; LEBLANC, A.; ELWOOD, J. M.; BORUGIAN, M.; ABANTO, Z.; SPINELLI, J. J. Plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma: a preliminary study. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 8, p. 1872–80, 2011..

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHIKD, A.; KIRKWOOD, J. M. Systematic Review of Medical Treatment in melanome: Current Status and Future Prospects. **The Oncologist**, v. 6, n.1, p. 5-24, 2011.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanome Biology and New Targeted Therapy. *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007.

INCA. Incidência 2014: Estimativa de Câncer no Brasil [S.l.; s.n.]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 20/04/2014.

LAFUENTE, A.; PEREIRO, N. Neurotoxic effects induced by endosulfan exposure during pregnancy and lactation in female and male rat striatum. **Toxicology**, v. 311, n. 1-2, p. 35–40, 2013.

LAGES, R. B.; BARBOSA, P. B.; ALMEIDA, I. P.; LOPES, L. R. S.; FILHO, L. L. L. Detecção precoce do câncer de pele: experiência de campanha de prevenção no Piauí-Brasil. **Rev Bras Promoç Saúde**, v. 25, n. 2, p. 221–227, 2012.

LIEBEL, S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SILVA, R.C.; RAMSDORF, W.A.; CESTARI, M.M.; MAGALHAES, V.F.; GARCIA, J.R.; ESQUIVEL, B.M.; FILIPAK NETO, F. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. **Toxicology In Vitro**, v. 25(7), p. 1493-1500, 2011.

LU, Y.; MORIMOTO, K.; TAKESHITA, T.; TAKECHI, T.; SAITO, T. Genotoxic Effects of α -Endosulfan and β - Endosulfan on Human HepG2 Cells. **Environmental Health Perspectives**, v.108, p. 559-61, 2000.

MELO, D. F.; SELL, A. M.; LOPES, M. C.; HIDALGO, M. M. Viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados. **Health Sciences**, v. 25, n. 1, p. 69–74, 2003.

PEYRE, L.; PASCAL, N. Z.; SOUSA, G.; LUZY, A. P.; RAHMANI, R. Potential involvement of chemicals in liver cancer progression: An alternative toxicological approach combining biomarkers and innovative technologies. **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 1507-20, 2014.

POTRICH, F. B. **Complexos naturais altamente diluídos reduzem fenótipo metastático de células de melanoma murino (B16F10)**. 126f. Curitiba, 2014. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RASTOGI, D.; NARAYAN, N. R.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D.K. Endosulfan induced cell death in Sertoli-germ cells of male *Wistar* rat follows intrinsic mode of cell death. **Chemosphere**, v. 94, p. 104-115, 2014..

RAU, A.; COUTINHO, A.; AVABRATHA K. S.; RAU, A. R.; WARRIER, R. P. Pesticide (Endosulfan) Levels in the Bone Marrow of Children with Hematological Malignancies. **Indian Pediatrics**, v. 49, 2012.

REUBER, M.D. The role of toxicity in the carcinogenicity of Endosulfan. **Sci Total Environ**, v. 20, p. 23-47, 1981.

SAIYED, H.; DEWAN, A.; BHATNAGAR, V.; SHENOY, U.; SHENOY, R.; RAJMOHAN, H.; PATEL, K.; KASHYAP, R.; KULKARNI, P.; RAJAN, B.; LAKKAD, B. Effect of Endosulfan on Male Reproductive Development. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 16, p. 1958–1962, 2003.

SAVARY, C.; JOSSÉ, R.; BRUYÈRE, A.; GUILLET, F.; ROBIN, M. A.; GUILLOUZO, A. Interactions of endosulfan and methoxychlor involving CYP3A4 and CYP2B6 in human HepaRG cells. **ASPET Journals**, 2014.

SHEN, L.; WANIA, F.; YING, D.L.; TEIXEIRA, C.; MUIR, D. C. G; BIDLEMAN, T.F. Atmospheric distribution and long-range transport behaviour of organochlorine pesticides in North America. **Environ Sci Technol**, v. 39, p. 409–20, 2005.

SIDDIQUE T.; OKEKE, B. C.; ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Biodegradation kinetics of endosulfan by *Fusarium ventricosum* and a *Pandora* species. **J Agric Food Chem**, v. 51, 2003.

SINGH, J. K.; NATH, A.; KUMAR, A.; KUMAR, R. Study on the Effect of Endosulfan on Testosterone Level and Seminiferous Tubule of Testis of Mice. **World Journal of Environmental Pollution**, v. 1, n. 1, p. 1–4, 2011.

SOHN, H. Y.; KWON, G.S.; KWON, C.S.; LEE, J. B.; KIM, E. Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 357-65, 2004.

SONG, M. O.; LEE, C.H.; YANG, H. O.; FREEDMAN, J. H. Endosulfan upregulates AP-1 binding and ARE-mediated transcription via ERK1/2 and p38 activation in HepG2 cells. **Toxicology**, v. 292, p. 23-32, 2012.

SOUZA, R. J. S. P.; REZENDE, M. L.; DUARTE, E. M.; MATTEDI, A. P.; CORRÊA, M. D. P. Estimativa do custo do tratamento de câncer de pele tipo melanoma no Estado de São Paulo - Brasil. **An Bras Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 237–243, 2009.

SOUZA, S. R. P.; FISCHER, F. M.; SOUZA, J. M. P.. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo : revisão da literatura. **Rev Saúde Pública**, v. 38, n. 4, p. 588–98, 2004.

VOLKOVOVA, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A.; LETASIOVÁ, S.; DUSINSKA, M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environmental health**, v. 11, n. 1, p. 12, 2012.