AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ANTIMÔNIO EM LINHAGENS DE NEUROBLASTOMA

Paloma da Costa (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Michele Dietrich Moura Costa (Orientador), e-mail: mi_dietrich@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ DEBIOGEM/SEBISA.

Área e subárea do conhecimento: 2.06.00.00-3 Morfologia

Palavras-chave: Trióxido de antimônio, viabilidade celular, cultivo celular, Hela, PC-12.

Resumo

O trióxido de antimônio é encontrado na crosta terrestre em níveis traços, no entanto, acredita-se que o aumento na utilização do elemento na indústria e de outras formas comerciais tenha elevado os níveis de antimônio livre na natureza. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do antimônio do Sb_2O_3 em linhagens celulares de feocromocitoma de rato (PC-12) e adenocarcinoma humano (Hela). As linhagens foram expostas a diferentes concentrações do rióxido de antimônio por 24h e 48h. A viabilidade foi avaliada através do método colorimétrico do MTT. O composto foi citotóxico para as células HeLa após 24h do tratamento. Já para as células PC12, em 24 horas após o tratamento, apenas a maior concentração foi citotóxica. Entretanto, após 48h de tratamento, o trióxido de antimônio foi capaz de induzir a morte celular a partir da concentração de 4 µM. Os resultados apresentados indicam a necessidade da continuidade de estudos voltados à avaliação da citotoxicidade do antimônio utilizando outras linhagens celulares.

Introdução

O antimônio (Sb) é um metal que pertencente a família 15 (5A), apresentando 5 elétrons na sua camada de valência, bem como a possibilidade de ter três estados de oxidação mais comuns, -3, +3 e +5. Embora seja possível observar o elemento em questão no ambiente, sua forma mais comum de utilização é como trióxido de antimônio ($Sb_2O_{3)}$ (ANDERSON, 2012).

Suas diversas formas estão presentes não apenas nos locais de mineração do elemento, mas também, no ar, na água de rios e lagos, e no mar, sendo liberados naturalmente na atmosfera através de tempestades de areia, erupções vulcânicas, e queimas de florestas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Considerado um composto tóxico, o antimônio (Sb) está presente na crosta terrestre em baixos níveis, cerca de 0,2 mg/kg, sendo que mais de 100 minerais de antimônio são encontrados no planeta (ANDERSON, 2012).

A mineração e o uso do antimônio na indústria têm aumentando a disponibilidade deste metal no ambiente. O uso atual de Sb_2O_3, empregado na fabricação de materiais retardantes de chama e resinas plásticas tal como o PVC (cloreto polivinílico) e em catalisadores para produção de PET 4 (tereftalato de polietileno), aumentou o consumo total de Sb nas ultimas décadas (BUTTERMAN; CARLIN, 2004).

O antimônio pode ser absorvido pelo organismo de formas variáveis, via dérmica, ou seja, diretamente pela pele, via inalação ou ingestão de alimentos contaminados, mas também por uma forma mais recentemente levantada, por meio de ingestão do próprio composto utilizado em embalagens industriais de alimentos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).
Até o momento, não há muitas informações sobre a toxicidade do antimônio, sendo assim, o presente trabalho avaliou a toxicidade do elemento em linhagens celulares.

Materiais e Métodos

Linhagens celulares
As linhagens celulares, feocromocitoma de rato (PC-12) e adenocarcinoma humano (Hela), foram mantidas em meio DMEM *High glucose* (Gibco) contendo Penicilina (100 U/ml, Gibco) e estreptomicina (10mg/L), e acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), a 37°C em 5% CO_2.

Obtenção de solução estoque de antimônio
O antimônio foi diluído como descrito por Lösler e colaboradores (2009). Primeiro foi feita uma solução estoque de 0,5 M de Sb_2O_3 em ácido clorídrico fumegante (37%, Synth). A solução estoque foi diluída em meio DMEM sem soro fetal bovino (SFB), obtendo-se uma concentração 128 µM que passou por um processo de diluições seriadas até que se obtivesse a concentração de 1 µM.

Análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico MTT
Semeou-se, em placas de 96 poços, 1 x 10^4 células/poço das linhagens feocromocitoma de rato (PC-12) e adenocarcinoma humano (Hela), em meio DMEM acrescido de soro fetal bovino (SFB) totalizando um volume de meio de 200 µL por poço. Após isso, as células foram mantidas na estufa a 5% de CO_2, com uma temperatura de 27°, por 24h.
Após 24h, as células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de Sb_2O_3, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µM, em meio DMEM sem SFB tendo como volume final por poço 200 µL. As células foram mantidas com o tratamento por 24 e e 48 horas, a 37 °C em estufa a 5% CO_2. Ao fim de cada tempo, o meio foi removido e, em cada poço, adicionou-se 50 µL de reagente MTT (0,5 mg/ml, Sigma Aldrich), as placas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% CO_2 por 3 horas.
Após, foi adicionado 100 µL de sulfóxido de dimetilo (DMSO, Synth). Utilizando leitora de microplacas Biotek Elx800, foram obtidas as absorbâncias dos poços através de uma leitura de 570nm, descontando o valor do branco manualmente.
Para determinar significância estatística foi usado o software GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e, por fim, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA One-Way) considerando $P<0,05$ como estatisticamente significativo.

Resultados e Discussão

Inicialmente o projeto tinha como objetivo avaliar a citotoxicidade do antimônio em linhagens celulares de origem neuronal, mas com a perda das linhagens devido as quedas de energias frequentes no Bloco M, o projeto foi adaptado às possibilidades, de modo que o foco tornou-se avaliar a citotoxicidade do antimônio apenas nas linhagens de PC-12 (figura 1) e Hela (figura 2). Para isto, tais linhagens foram submetidas a tratamentos em diferentes concentrações de Sb_2O_3 (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µM) por 24 e 48h.

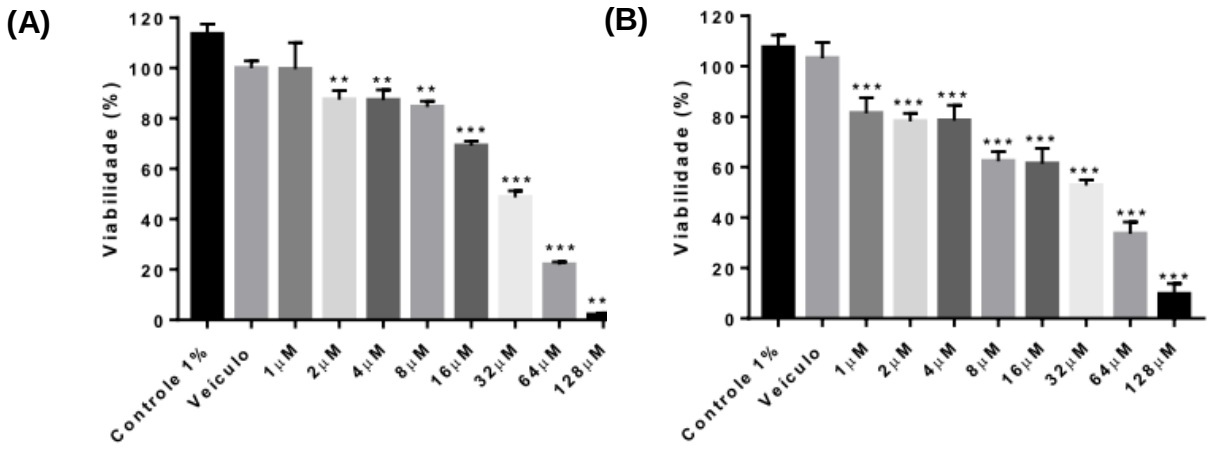


Figura 01 – Efeito citotóxico na linhagem HeLa após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição a diferentes concentrações do Sb_2O_3.

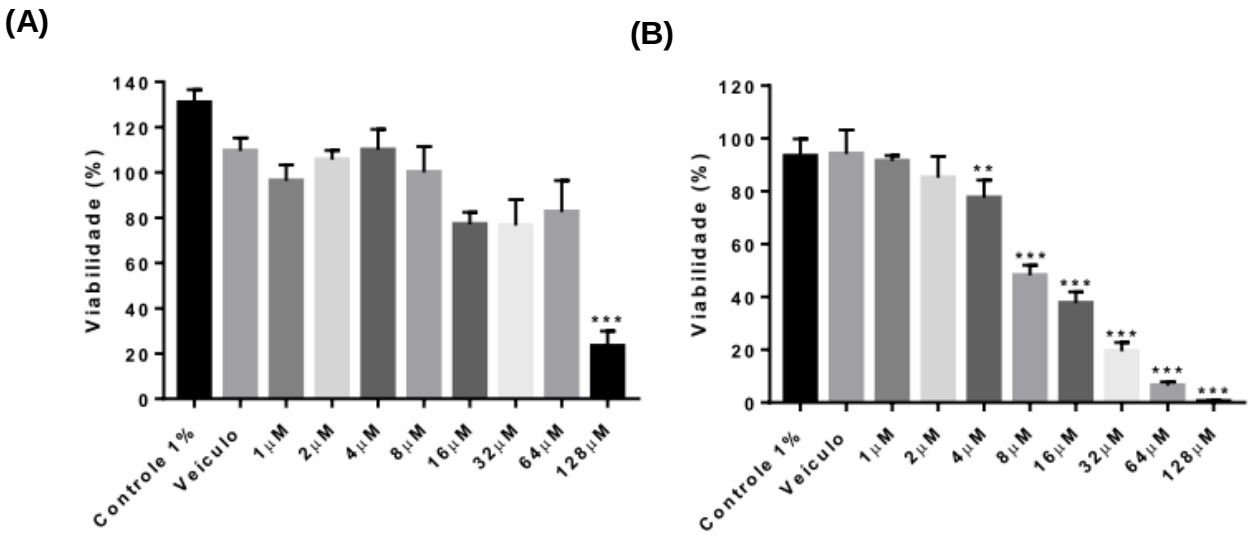


Figura 02 – Efeito citotóxico na linhagem PC-12 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição a diferentes concentrações do Sb2O3.

Foi possível observar que em 24 horas (Figura 1, A) o composto apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 2 µM. Já em 48h (figura 1, B) a menor concentração testada (1 µM) foi capaz de matar as células da linhagem HeLa.

Nas células PC12 após 24 horas de tratamento com antimônio (figura 2, A), apenas a maior concentração (128 µM) foi citotóxica. Em 48 h (figura 2, B) já foi possível verificar morte celular a partir de 4 µM.

Conclusões

O trióxido de antimônio foi tóxico para as linhagens celulares utilizadas neste projeto.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária e a todos que trabalharam comigo durante esse ano no Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia da UEPG, bem como minha orientadora Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa pelo apoio.

Referências

ANDERSON, C. G. The metallurgy of antimony. **Chemie der Erde**, v.72, n.4, p.3-8, Jul. 2012.

BUTTERMAN, W. C.; CARLIN, J. F. Jr. Mineral Commodity Profiles Antimony **U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR U.S. GEOLOGICAL SURVEY**, 2004.

FILELLA, M.; BELZILE, N.; CHEN, Y.-W. Antimony in the environment: a review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews**, v.57, n.57, p.125–176, maio. 2002.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Mol Biol Int**, v.2011, n.2001, jun. 2011.

LÖSLER, S. et al. Antimony-trioxide- and arsenic-trioxide-induced apoptosis in myelogenic and lymphatic cell lines, recruitment of caspases, and loss of mitochondrial membrane potential are enhanced by modulators of the cellular glutathione redox system. **Annals of Hematology**, v. 88 n.11, p.1047-1058. 2009.

MANN, K. K. et al. Antimony trioxide-induced apoptosis is dependent on SEK1/JNK signaling. **Toxicol Lett**, v.160, n.2, p.158-70, jan. 2006.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J., Antimony Toxicity. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 7, n.1, p.4267-4277, dez. 2010.

JIANG, X. et al. The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. **Toxicology Letters**, v.256, n.2016, p.11–18, maio. 2016.