

SETAC - Brazil

## Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos

D. PRÁ,<sup>1</sup> T. GUECHEVA,<sup>1,2</sup> S. I. R. FRANKE,<sup>1,3</sup> T. KNAKIEVICZ,<sup>1</sup> B. ERDTMANN<sup>1,4</sup> & J. A. P. HENRIQUES<sup>1,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS

<sup>2</sup>Departamento de Biologia e Química, UNIJUÍ, Ijuí, RS

<sup>3</sup>Curso de Nutrição, Departamento de Educação Física e Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS

<sup>4</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS

<sup>5</sup>Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS

### RESUMO

A contaminação ambiental com compostos contendo metais pesados é preocupante, pois estes têm alta toxicidade, capacidade de bioacumulação e potencialidade de induzir danos ao material genético. O sulfato de cobre tem largo emprego tanto em processos industriais quanto na agricultura. A comparação dos efeitos tóxicos e genotóxicos entre espécies é fundamental para avaliar o risco biológico de poluentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar os danos gerados pelo sulfato de cobre em diferentes sistemas biológicos. Foram utilizados dois eucariotos distintos no que diz respeito à posição evolutiva: planárias, um dos primeiros metazoários, e camundongos, um metazoário complexo que possui ampla similaridade biológica com os humanos. Em planárias, o sulfato de cobre induziu danos ao DNA de forma dose-dependente ( $r = 0,984$ ;  $p < 0,001$ ), quando avaliado pelo teste cometa. As doses maiores ( $3-5 \times 10^{-5}$  M  $\text{CuSO}_4$ ) induziram significativamente mais danos que os controles negativos. Doses dez vezes menores induziram efeitos significativos no tratamento crônico. Estudos de reparo, por sua vez, mostraram a persistência do dano ao DNA 24 h após a exposição aguda. O pós-tratamento com  $\text{CuSO}_4$  diminuiu o reparo dos danos causados pelo agente alquilante de DNA metil metanosulfonato (MMS). O sulfato de cobre (nas doses de 0,06 a  $1,2 \times 10^{-5}$  M  $\text{CuSO}_4$ ) também induziu alterações na regeneração das planárias, de maneira dose-dependente ( $r = 0,822$  e  $p < 0,001$ ). Em camundongos, a dose de 20,72 mg  $\text{CuSO}_4$  por kg de peso corporal induziu aumento significativo dos danos no DNA, quando avaliados pelo ensaio cometa após 24 h. O reparo foi efetivo após 48 h ( $p < 0,01$ ). Os resultados deste estudo revelaram o potencial tóxico e genotóxico do sulfato de cobre e a capacidade de interferência com processo de reparo do dano no DNA causado por outras substâncias, sugerindo possível efeito modulador da genotoxicidade em combinação com outros agentes no ambiente.

*Palavras-chave:* sulfato de cobre, planária, camundongo, genotoxicidade, teste cometa.

### ABSTRACT

#### Toxicity and genotoxicity of copper sulphate in freshwater planarians and mice

Environmental contamination with copper-containing compounds is significant. Copper sulfate is largely applied in industrial and agricultural processes. To compare the toxicity of compounds between species is fundamental for predicting environmental hazards. The goal of this paper is to compare the toxicity and genotoxicity of copper sulfate between planarians, an early eukaryote, and mice, a mammal with striking similarities with humans. In planarians, copper sulfate induced DNA damages in a dose-related fashion ( $r = 0.984$ ;  $p < 0.001$ ) and the higher doses of the compound induced more damage than the controls when evaluated by the comet assay. Doses ten fold lower than the used in acute tests induced significant genotoxicity in chronic tests. Repair studies showed a low repair capability for the acute doses after 24 h. The post-treatment with  $\text{CuSO}_4$  reduced the repair of the DNA damages generated by the DNA alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS). The copper sulfate also induced significant concentration-related influence in planarian

\*Corresponding author: João Antonio Pêgas Henriques, e-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br.

regeneration ( $r = 0.822$  and  $p < 0.001$ ). In mice, a dose of 20.72 mg  $\text{CuSO}_4$  per kg of body weight induced a significant increase in DNA damage 24 h after the exposure; and the repair was effective after 48 h from the exposure, when evaluated by the comet assay. Results indicate toxicity and genotoxicity as well as repair interference potential for copper sulfate, supporting a possible interference of the metal in the toxicity of environmental pollutants.

**Key words:** cupric sulfate, planarian, mouse, genotoxicity, comet assay.

## INTRODUÇÃO

Estudos recentes apontam que metais como ferro, cobre e cromo atuam em ciclo redox, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) (Stohs & Bagchi, 1995). As EROs e o estresse oxidativo gerado por estas induzem a peroxidação de lipídios, danos no DNA e alteram a homeostasia de diversos minerais essenciais. Adicionalmente, o estresse oxidativo afeta diversas rotas metabólicas, incluindo aquelas envolvidas no reparo de danos ao DNA. O sulfato de cobre tem largo emprego tanto em processos industriais quanto na agricultura, como fungicida, e na dieta humana, como suplemento alimentar. O cobre é comumente encontrado em diversos compartimentos dos ecossistemas, sendo um poluente de importância significativa (Teisseire *et al.*, 1998).

A comparação dos efeitos tóxicos e genotóxicos entre espécies é fundamental para avaliar o risco biológico de poluentes, particularmente para compostos persistentes no meio ambiente (Bolognesi *et al.*, 1999). Planárias de água doce são sensíveis a poluentes, têm ampla distribuição, são de cultivo fácil e barato, atributos que favorecem a sua utilização como bioindicador. Os camundongos têm amplo emprego em estudos, são similares aos humanos e compartilham o mesmo habitat com os últimos.

O ensaio cometa é uma ferramenta sensível para quantificar danos no DNA, bem como o processo de reparação dos mesmos, e é amplamente empregado em estudos de genética toxicológica e monitoramento ambiental (Fairbairn *et al.*, 1995; Tice, 1995; Collins *et al.*, 1997). A versão alcalina do teste, descrita por Singh *et al.* (1988), permite medir a ocorrência de quebras simples e dupla, sítios alcali-lábeis e cross-links no DNA.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos tóxicos e genotóxicos do sulfato de cobre em planárias e camundongos, além de elucidar alguns aspectos do reparo de danos no DNA induzidos pelo sulfato de cobre nos dois organismos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Testes em planárias

Foram utilizadas neste estudo planárias da espécie *Girardia schubarti*. Os animais foram cultivados em água reconstituída e alimentados semanalmente com fígado bovino. Planárias medindo entre 5 e 8 mm foram expostas aos tratamentos. Para determinação da toxicidade, as planárias foram expostas a sulfato de cobre dissolvido em água de cultivo em

diferentes concentrações por 24 h ou por 7 dias (com as soluções sendo trocadas diariamente) a 19°C. Em cada experimento 8 planárias foram analisadas.

Planárias regenerantes foram obtidas pela decapitação na região imediatamente abaixo das aurículas para os estudos de alteração na regeneração. Grupos de 20 planárias regenerantes foram submetidas a soluções de sulfato de cobre nas concentrações de 0,06, 0,15, 0,6 e 1,2  $\mu\text{M}$  de Cu, dissolvidos em água de cultivo. Os seguintes marcadores de regeneração foram observados: a) aparecimento de cicatriz (dia 1); b) emergência de blastema (dia 2); c) formação de ocelos completos (dia 3); e d) emergência de aurículas (dia 4). As planárias não foram alimentadas durante os testes e os animais foram avaliados em intervalos subsequentes de 24 h, quando o número de animais apresentando um marcador de regeneração específico foi anotado (Calevro *et al.*, 1998, 1999).

A genotoxicidade do sulfato de cobre foi avaliada pelo ensaio cometa: a 2 h, nas concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e  $5,0 \times 10^5$  M; e a 7 dias, nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e  $1,0 \times 10^5$  M. O teste cometa também foi utilizado para avaliar a cinética de reparo do DNA. As planárias foram tratadas por duas horas com MMS [ $8 \times 10^5$  M] e, posteriormente, incubadas por 2, 4 e 24 h em água de cultivo (pós-incubação) ou por 2, 4 e 24 h na presença de  $2 \times 10^5$  M  $\text{CuSO}_4$  (pós-tratamento). Planárias não tratadas foram também incubadas por 2, 4 e 24 h em água de cultivo contendo ou não  $\text{CuSO}_4$  [ $2 \times 10^5$  M].

### Camundongos

Camundongos da linhagem CF1 pesando entre 25 e 30 gramas, com idade entre 5 e 7 semanas, foram obtidos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, RS. Antes dos testes os animais foram aclimatizados por 7 dias, recebendo ração e água *ad libitum* e, então, foram tratados por gavagem.

### Ensaio cometa

A versão alcalina do teste cometa foi executada segundo Tice (1995). Para as planárias, as lâminas foram confeccionadas a partir de uma suspensão celular obtida pela tripsinização dos organismos (4-8 por amostra). Já, para cada camundongo, uma gota de sangue da cauda foi coletada em um microtubo contendo heparina, o que se constituiu no material de interesse. Cem células selecionadas aleatoriamente foram analisadas para cada amostra/animal. As células foram classificadas de acordo com o formato da imagem em cinco classes (sem dano = 0, dano máximo = 4). Desse modo, constituindo um índice de dano

para cada amostral/animal variável de 0 (sem dano algum – 100 células  $\times$  0) a 400 (dano máximo – 100 células  $\times$  4).

### Análises estatísticas

As análises estatísticas foram executadas pelo programa GraphPad Prism 3.0. Os dados de toxicidade foram analisados pela análise de Probit para determinar os valores de  $LC_{50}$ . Os danos ao DNA nos camundongos em relação ao controle e entre 24 e 48 h foram comparados pelo teste *t* de Student. Para as análises de correlação foi utilizado o coeficiente de Pearson. O nível de significância foi de 0,05.

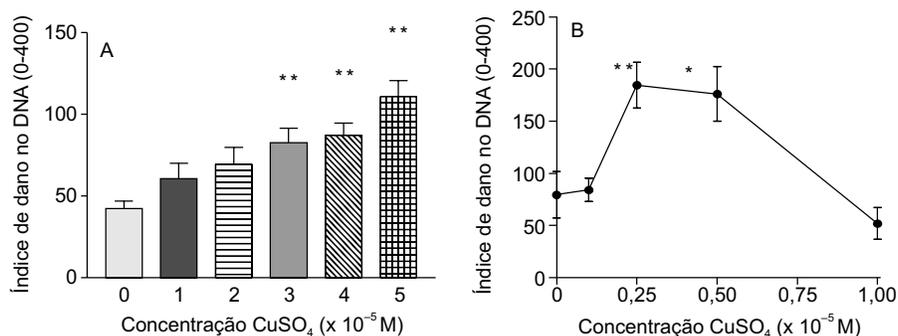
## RESULTADOS

Em planárias, a  $LC_{50}$  foi de 1230  $\mu$ g Cu/L a 24 h e de 480  $\mu$ g Cu/L a 7 dias. O sulfato de cobre causou atraso na

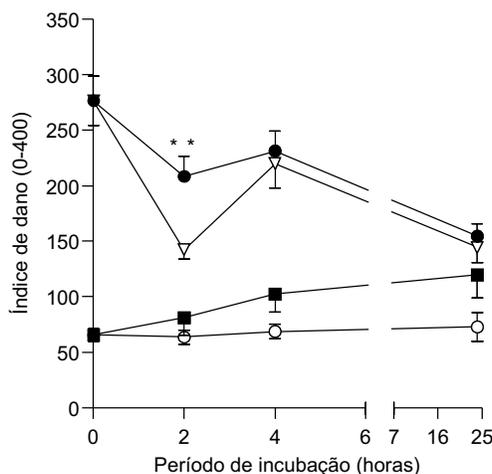
regeneração de maneira concentração-dependente ( $r = 0,822$ ;  $p = 0,001$ ) num intervalo de concentrações que variou de 0,06 a  $1,2 \times 10^{-5}$  M  $CuSO_4$ .

Foi observado aumento no dano ao DNA de forma concentração-dependente após 2 h (Figura 1A) e 7 dias (Figura 1B) de exposição ao cobre quando avaliado pelo ensaio cometa.

As planárias tratadas com MMS e incubadas na presença de sulfato de cobre mostraram persistência de lesões ao DNA após 2 h (Figura 2). A 4 h, houve aumento no dano de DNA em relação ao dano após 2 h, que pode ser atribuído a quebras no DNA introduzidas durante o reparo. O dano no DNA no grupo de pós-incubação permanece elevado em relação ao controle 24 h e 48 h após tratamento. O tratamento de 48 h com sulfato de cobre  $2 \times 10^{-5}$  M mostrou-se tóxico tanto no grupo controle como no grupo de pós-tratamento.



**Figura 1** — Efeito genotóxico do sulfato de cobre em planárias. A – após 2 h de tratamento. B – após 7 dias de tratamento. Média e desvio-padrão de 4-6 experimentos. Significativamente diferente do controle: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  pelo teste de ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett.



**Figura 2** — Cinética de reparo do dano ao DNA causado por MMS na presença de  $CuSO_4$  em planárias. Tratamento por 2 h com MMS ( $8 \times 10^{-5}$ ) e incubadas em água de cultivo (▽) – pós-incubação, ou na presença de  $2 \times 10^{-5}$  M  $CuSO_4$  (●) – pós-tratamento. Planárias não tratadas também foram incubadas em água de cultivo (○), ou na presença de  $2 \times 10^{-5}$  M  $CuSO_4$  (■). Média e desvio-padrão de 5-7 experimentos. \*\*Significativamente diferente do valor correspondente à pós-incubação,  $p < 0,01$ .

Em camundongos, o sulfato de cobre induziu aumento de dano ao DNA em relação ao controle negativo, após 24 h. Uma redução significativa, em comparação com 24 h, nos danos ao DNA foi observada 48 h após exposição ( $p < 0,01$ ).

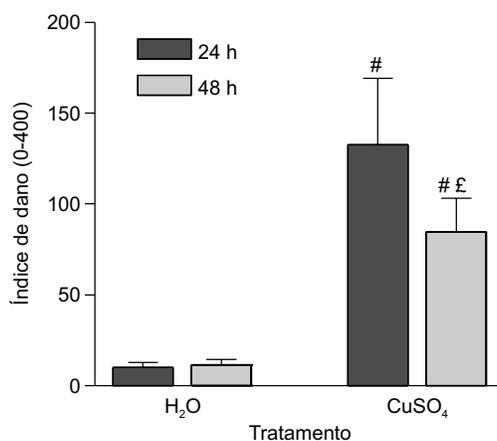
## DISCUSSÃO

Nossos resultados apontaram efeito tóxico e genotóxico do sulfato de cobre em planárias de água doce e em camundongos. Os testes de regeneração apontaram um potencial teratogênico, principalmente em relação ao tempo de regeneração. Esse atraso poderia indicar o risco de mal-formações embrionárias. O efeito genotóxico pode ser atribuído à indução de EROs, via reação do tipo Fenton, que pode causar danos em componentes celulares como DNA e proteínas. Diferentemente dos estudos *in vitro*, nossos resultados, *in vivo* com planárias e camundongos, apontam reparo mais lento, de modo que o dano ao DNA não volta ao nível basal 24 h ou 48 h do início da exposição. Isso acentua a importância dos testes *in vivo* que permitem avaliar a influência da homeostasia sobre a estabilidade do material genético.

O ensaio cometa não prevê necessariamente o potencial mutagênico das substâncias testadas, uma vez que detecta alterações no DNA que podem ou não ser reparadas eficientemente. Contudo, vários trabalhos já apontaram o efeito mutagênico de compostos contendo cobre. Uma das possíveis razões da genotoxicidade do cobre é a interferência do elemento

sobre os mecanismos celulares de reparo do DNA. Para avaliar isso, as planárias foram expostas ao MMS, um agente alquilante de ação direta, e, posteriormente, incubadas na ausência e na presença de  $\text{CuSO}_4$ . Observou-se inibição do reparo, que pode ser atribuída à inibição das enzimas de reparo: a) pela ligação ao sítio ativo, em substituição ao co-fator responsável pela reatividade das moléculas; b) pela desnaturação mediada pela interação do cobre com os grupos sulfidril; e c) pela inibição dos passos de polimerização e ligação na fita do DNA durante o processo de reparo. Além disso, pode ocorrer efeito sinérgico gerado pelas EROs produzidas pelo cobre. A inibição do reparo de DNA em presença de sulfato de cobre poderia acentuar o efeito mutagênico do MMS e, supostamente, de outros agentes alquilantes.

A concordância das respostas genotóxicas em planárias e em camundongos valida o uso de planárias para a avaliação da toxicidade e genotoxicidade de compostos metálicos *in vivo* pelo ensaio cometa. Além disso, reforça a utilidade dos estudos de regeneração em planárias. Desse modo, as planárias podem ser utilizadas para avaliar riscos ambientais relacionados à exposição aguda e crônica a químicos, em ecossistemas aquáticos. O efeito inibitório dos íons de cobre sobre o reparo de lesões ao DNA induzidas por MMS aponta efeito modulatório do metal sobre o efeito genotóxico de misturas ambientais de natureza complexa. Estudos adicionais são necessários para analisar a interferência de metais sobre o reparo de DNA



**Figura 3** — Genotoxicidade do sulfato de cobre em células sanguíneas de camundongos avaliada pelo ensaio cometa. # Significativamente maior em relação à água a 24 h e a 48 h ( $p < 0,01$ ). £ significativamente menor que o dano a 24 h ( $p < 0,01$ ). Análise pelo teste *t* de Student.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BOLOGNESI, C., LANDINI, E., ROGGIERI, P., FABBRI, R. & VIARENGO, A., 1999, Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.*, 33: 287-292.
- CALEVRO, F., FILIPPI, C., DERI, P., ALBERTOSI, C. & BATISTONI, R., 1998, Toxic effects of Aluminum, Chromium and Cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere*, 37: 651-659.
- CALEVRO, F., CAMPINI, S., FILIPPI, C., BATISTONI, R., DERI, P., BUCCI, S., RAGGHIANI, M. & MANCINO, G., 1999, Biossays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian *Pleurodeles waltl* and regeneration in the planarian *Dugesia etrusca*. *Aquatic Ecosystem Health Management.*, 2: 281-288.
- COLLINS, A. R., DUSINSKA, M., FRANKLIN, M., SOMOROVSKA, M., PETROVSKA, H., DUTHIE, S., PANAYIOTIDIS, M., RASLOVA, K. & VAUGHAN, N., 1997, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30: 139-146.
- FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P. L. & O'NEILL, K. L., 1995, The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339: 37-59.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. & SCHNEIDER, E. L., 1988, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
- STOHS, S. J. & BAGCHI, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.*, 18: 321-336.
- TEISSEIRE, H., COUDERCHET, M. & VERNET, G., 1998, Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. *Ecotox. Environ. Safety.*, 40: 194-200.
- TICE, R. R., 1995, Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants, In: F. M. Butterworth (ed.), *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. Plenum Press, New York, pp. 314-327.