



EFEITO CITOTÓXICO DO PARAQUAT SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO: PAPEL PROTETOR DA ERVA-MATE

Thais dos Santos da Costa¹; Patrícia Rizzi Vieira¹; Camila Pileco Capeleti¹; Josiane Woutheres Bortolotto²; Gabriela Bonfanti³; Mariana Migliorini Parisi⁴

Palavras-chave: Paraquat. Erva-mate. Citotoxicidade. Viabilidade celular.

1 INTRODUÇÃO

O paraquat (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio) (PQ) é um herbicida amplamente utilizado na agricultura. No entanto, é altamente tóxico para humanos e animais, com numerosos relatos de fatalidades após ingestão acidental ou deliberada deste agrotóxico. Devido à ampla gama de uso na agricultura, o PQ tornou-se o herbicida com maior taxa de mortalidade por intoxicação aguda e teve seu uso proibido ou restrito em mais de 50 países (KONTHONBUT et al., 2018). O principal mecanismo de sua toxicidade é baseado no ciclo redox e na geração de estresse oxidativo intracelular (WU et al., 2018), que pode ser causador de morte celular.

A erva mate (*Ilex paraguariensis*) (EM) tem sido estudada devido a uma grande variedade de propriedades benéficas, entre elas as antioxidantes, geralmente atribuídas à compostos fenólicos e alcaloides (FERNANDES et al., 2017). Estudos mostram que a EM é capaz de aumentar a capacidade antioxidante do sangue, além de prevenir o dano oxidativo celular (COLPO et al., 2018). Sendo assim, a EM apresenta um potencial antioxidante que pode prevenir efeitos citotóxicos de xenobióticos sobre sistemas biológicos.

Desta forma, considerando que o PQ é um agrotóxico amplamente utilizado na agricultura e é um agente causador de danos oxidativos celulares e que a EM possui poder antioxidante e é amplamente utilizada como bebida na região do Rio Grande do Sul, este estudo avaliou o possível efeito citotóxico do PQ sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e o possível efeito protetor da EM sobre os danos observados.

¹ Biomédica formada pela Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mails: thais.coosta@outlook.com; patirizzi1@gmail.com; camilapileco15@gmail.com

² Docente na Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil e pesquisadora PPGAIS. E-mail: gbonfanti@unicruz.edu.br

³ Docente na Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil e pesquisadora PPGAIS. E-mail: bortolotto@unicruz.edu.br

⁴ Docente e coordenadora do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil e pesquisadora PPGAIS. E-mail: mparisi@unicruz.edu.br.



2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

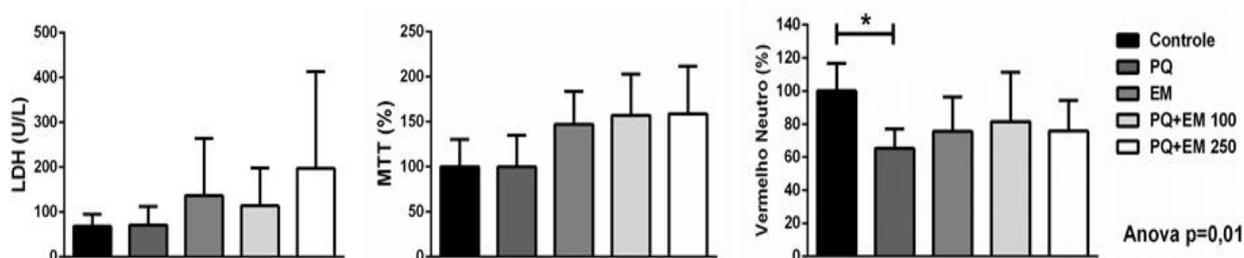
Foram selecionados, de forma voluntária, 8 indivíduos saudáveis para participar do estudo. Foram coletados de cada indivíduo 20 mL de sangue venoso periférico com EDTA, do qual foram isoladas as células mononucleares (PBMC) através da metodologia de Gradiente de *FicollPaque Plus*. Para realizar o tratamento, foram utilizadas 15×10^6 células de cada indivíduo, divididas em 5 grupos (3×10^6 PBMC em cada grupo). O grupo G1 foi o grupo controle, o qual foi incubado por 150 min apenas com PBS; o grupo G2 foi incubado com PBS por 30 minutos seguido de PBS suplementado com 1mM de PQ por mais 120 min. O grupo G3 foi incubado com PBS suplementado com 100mg/ml de EHEM por 150 minutos. O grupo G4 foi incubado com PBS suplementado com 100 mg/ml de EHEM por 30 minutos seguido de PBS suplementado com 100 mg/ml de EHEM e 1mM de PQ por mais 120 minutos. O grupo G5 foi incubado com PBS suplementado com 250 mg/ml de EHEM por 30 minutos seguido de PBS suplementado com 250 mg/ml de EHEM e 1mM de PQ por mais 120 minutos. Após o tratamento, foram realizados os seguintes ensaios de viabilidade celular: incorporação de corante supravital vermelho neutro (VN), atividade de desidrogenases mitocondriais (MTT) e liberação de desidrogenase láctica (LDH).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cruz Alta (CAAE: 02850818.8.0000.5322, Parecer: 3.085.361).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos nos três testes de viabilidade estão representados na Figura 1.

Figura 1. Citotoxicidade do PQ e efeito protetor da EM em diferentes ensaios de viabilidade celular.



Fonte: Thais da Costa, 2019. LDH: liberação de desidrogenase láctica; MTT: atividade de desidrogenases mitocondriais; PQ: paraquat EM: erva mate.



Foi possível constatar, através do ensaio de VN, que a exposição aguda a 1mM de PQ causou diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle. Estes resultados foram semelhantes aos do estudo de HOSHINA et al. (2018), que mostrou diminuição da viabilidade celular após tratamento *in vitro* de células A549 com 250 μ M de PQ durante 24h. Neste contexto, tem sido descrito que a viabilidade celular diminui de uma maneira dependente da dose após a exposição ao PQ (KANNO et al., 2019).

Quando avaliamos pelo teste de MTT e de LDH, não foi possível detectar citotoxicidade de 1mM de PQ em PBMC. Um ponto importante de se avaliar é que a geração de EROs sustentada por substâncias químicas, como o PQ, pode desencadear a apoptose (PAPACONSTANTINO; HSIEH, 2010), processo no qual as células não sofrem danos na membrana celular, pois são englobadas por fagócitos para impedir a liberação de materiais intracelulares potencialmente nocivos para o meio extracelular (JENZER et al., 2018). Isso explicaria a não detecção de citotoxicidade pelo ensaio de LDH, já que a perda de LDH intracelular e sua liberação no meio de cultura indica morte celular devida aos danos na membrana celular (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Já a EM, nas duas concentrações testadas (100 e 250 mg/ml), não foi capaz de proteger as células expostas ao PQ da citotoxicidade, no tempo testado. Entretanto, é possível perceber uma tendência no aumento da atividade de desidrogenases mitocondriais em todos grupos expostos a EM quando avaliamos pelo teste de MTT. Os antioxidantes presentes na EM podem interferir na geração e destino de radicais livres, tanto em níveis mitocondriais e nucleares, como também no meio extracelular (BRACESCO et al., 2018). Sendo assim, uso da EM pode ser considerada de grande importância farmacológica devido à sua facilidade de disponibilidade e também pela presença de uma grande variedade de compostos benéficos à saúde.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo foi constatado a citotoxicidade do PQ através do ensaio de VN. A EM não foi capaz de proteger as PBMC contra a citotoxicidade causada pelo PQ, no tempo e concentrações testadas, apesar de apresentar uma tendência no aumento da atividade de desidrogenases mitocondriais em todos grupos expostos a EM. Este estudo sugere que a EM deve ser melhor estudada em prol de melhor avaliar os seus possíveis efeitos benéficos sobre PBMC na prevenção de danos induzidos por PQ.



REFERÊNCIAS

BRACESCO, N. et al. Analysis of radioprotection and antimutagenic effects of *Ilex paraguariensis* infusion and its component rutin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 9, 2018.

COLPO, A. C. et al. *Ilex paraguariensis* extracts extend the lifespan of *Drosophila melanogaster* fed a high-fat diet. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 2, 2018.

FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 1, p. 98-104, 2017.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

HASSUNEH, M. R.; ALBINI, M.; TALIB, W. H. Immunotoxicity induced by acute subtoxic doses of paraquat herbicide: Implication of shifting cytokine gene expression toward T-helper (TH)-17 phenotype. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 10, p. 2112-2116, 2012.

HOSHINA, C. et al. Paraquat toxicity is attenuated by 4-phenylbutyrate-induced phosphorylation of ERK2 via PI3K in A549 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 503, n. 2, p. 809-814, 2018.

JENZER, C. et al. Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2. **Autophagy**, n. just-accepted, 2018.

KANNO, S. et al. Cellular uptake of paraquat determines subsequent toxicity including mitochondrial damage in lung epithelial cells. **Legal Medicine**, v. 37, p. 7-14, 2019.

KONTHONBUT, P. et al. Paraquat Exposure of Pregnant Women and Neonates in Agricultural Areas in Thailand. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 6, p. 1163, 2018.

PAPACONSTANTINO, J.; HSIEH, C. Activation of senescence and aging characteristics by mitochondrially generated ROS: how are they linked? 2010.

WU, Q. et al. A new sight for paraquat poisoning from immunology. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, p. 1-4, 2018.