



Evento	Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2015
Local	Porto Alegre - RS
Título	Utilização do cultivo primário de células de brânquias de grumatã na análise de citotoxicidade de águas
Autor	MARINA GRIEBELER MOREIRA
Orientador	ANA LUIZA ZIULKOSKI
Instituição	UNIVERSIDADE FEEVALE

Células de brânquias vêm sendo utilizadas na avaliação da toxicidade de xenobióticos em ambientes aquáticos. O *Prochilodus lineatus* (grumatã) tem uma ampla distribuição na Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos (BHRS) e sua criação em cativeiro é corriqueira. O objetivo deste estudo foi padronizar um protocolo de cultivo primário de brânquias de grumatã para avaliação de efeitos citotóxicos da água da BHRS. Peixes de 10-20 cm foram aclimatados em água dechlorada por 10 dias, com adição de neomicina nas últimas 24h. Foram anestesiados em gelo, decapitados e as brânquias foram extraídas e lavadas (6 x 10 min) com solução salina contendo antibióticos e antifúngico. A seguir foram incubadas (2x) em tripsina 1:250 por 10 min a 30°C; o homogenato celular obtido foi filtrado em malha de nylon de 100 µm e centrifugado a 400 xg por 10 min. As células obtidas foram contadas em hemocítmetro e mantidas em meio Leibovitz suplementado com 15% de soro fetal bovino e antibióticos (Lbv-SFB/A), em sistema fechado a 28°C. Após 20h em cultivo, 50% das células estavam aderidas. Os cultivos foram lavados diariamente com solução salina e mantidos em Lbv-SFB/A por até 14 dias. Proliferação celular foi observada apenas nas primeiras 48 h de cultivo, ocorrendo hipertrofia celular após 7 dias. Após coloração com hematoxilina/eosina, observamos pequenos agrupamentos de dez ou mais células caracterizadas por um aspecto ameboide, com tamanho de 58 µm, onde as mais periféricas apontam vários prolongamentos celulares. Destacam-se núcleos esféricos com domínio de eucromatina e nucléolo evidente. Observamos também tapetes celulares, no mesmo plano, compostos por células grandes de 175 µm e aspecto estrelado; seus longos prolongamentos ocupam grandes áreas formando leques, evidenciado pelas “fibras de estresse”, núcleo em forma de elipse com farta eucromatina e 2 nucléolos, contendo uma fina granulação restrita ao entorno do núcleo. É importante salientar que durante as primeiras 48h de cultura seu formato foi estrelado e/ou fusiforme, porém de menor tamanho e com prolongamentos curtos e afilados, núcleos em elipse, mas com menos eucromatina, e a granulação foi dispersa no citoplasma, inclusive sob os prolongamentos. Após o isolamento, $4,0 \times 10^7$ células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços, mantidas em meio Lbv-SFB/A, em sistema fechado a 28°C por 24h. Então, as células foram lavadas com solução salina e expostas aos meios-teste preparados com água de amostras de quatro pontos de áreas alagadas da BHRS: Rolante, Campo Bom, Novo Hamburgo e São Leopoldo. Ao final do período de exposição (24h), a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de incorporação do Vermelho Neutro (VN). Como controle negativo foram utilizadas células mantidas com o meio de cultivo padrão, e como controle positivo culturas expostas a peróxido de hidrogênio 1% por uma hora. Os resultados demonstraram que os cultivos primários são capazes de responder ao ensaio de citotoxicidade, uma vez observamos perda de 80% da viabilidade lisossomal no controle positivo. Com relação aos pontos de coleta, apenas Campo Bom foi diferente do controle negativo, com aumento de 85% na viabilidade, indicando efeito proliferativo. Dessa forma, podemos afirmar que obtivemos sucesso no isolamento das células de brânquias de grumatã, e que os cultivos primários podem ser aplicados nas avaliações toxicológicas ambientais *in vitro*.

