

**DIETA CONTENDO DISSELENETO DE DIFENILA PROTEGE CONTRA A
IMUNOTOXICIDADE INDUZIDA PELO CLORETO DE METILMERCÚRIO VIA
SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA USANDO CARPAS (*Ctenopharyngodon idella*)
COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Cristiano dos Santos Siqueira¹; Matheus Dellaméa Baldissera²

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina, Universidade Franciscana (UFN), Rio Grande do Sul,
Brasil - cristiano.siqueira@ufn.edu.br;

² Orientador. Professor do Curso de Biomedicina, Universidade Franciscana (UFN), Rio
Grande do Sul, Brasil – matheus.dellamea@ufn.edu.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar se uma dieta contendo disseleneto de difenila (Ph_2Se_2) preveniria prejuízos imunológicos nas respostas imunes e inflamatórias provocadas pelo cloreto de metilmercúrio (CH_3HgCl) via efeitos protetores na sinalização purinérgica em órgãos imunes de peixes. A atividade tecidual e linfocítica da enzima nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) para adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) foi significativamente menor no rim cefálico e no baço da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) exposta ao CH_3HgCl comparada a peixes não expostos ao CH_3HgCl . Concomitantemente, a atividade da enzima adenosina desaminase (ADA) foi significativamente maior em peixes expostos ao CH_3HgCl comparado a peixes não expostos. A suplementação dietética com Ph_2Se_2 melhorou essas alterações mediadas por CH_3HgCl nas enzimas purinérgicas e suas atividades retornaram a níveis basais (exceto a atividade da NTPDase para o ADP). Com base nesses resultados, a sinalização purinérgica em órgãos imunes e linfocíticos podem ser consideradas uma via ligada a efeitos pró-inflamatórios durante a exposição a concentrações ambientais de CH_3HgCl , o que pode contribuir para a mortalidade dos peixes afetados. A suplementação dietética com 3 mg de $\text{Ph}_2\text{Se}_2/\text{kg}$ na ração preveniu as alterações induzidas pelo CH_3HgCl , podendo ser considerada um potencial tratamento para prevenir respostas imunes e inflamatórias prejudicadas pelo CH_3HgCl .

Palavras-chave: sistema imune; selênio; mercúrio; ATP.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história da humanidade, o peixe foi considerado um alimento básico na dieta humana por ser uma fonte importante de vitaminas, minerais, aminoácidos e ácidos graxos essenciais (OSMONDE AND COLOMBO, 2019; GRGEC, 2022). Atualmente, a produção de animais aquáticos é o setor de produção de animais que mais cresce no mundo, e deve se expandir ainda mais para atender a um crescente aumento da população mundial (UNITED UNIONS, 2017). No Brasil, o consumo de peixe cresceu exponencialmente nos últimos anos, uma vez que a população passou a conhecer melhor seus benefícios nutricionais (CRUZ *et al.*, 2021), inclusive o consumo da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), um dos mais importantes peixes cultivados e comercializados no Rio Grande do Sul (ARANTES *et al.*, 2010) e uma das espécies mais produzidas no Brasil (ARANTES *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2021).

Entretanto, o mercúrio (Hg) vem sendo um contaminante global, persistente e bioacumulativo liberado por fontes naturais ou antropogênicas (TINÔCO *et al.*, 2010). Reconhecido por seu potencial tóxico e teratogênico, é capaz de se bioacumular nos tecidos comestíveis e biomagnificar através da cadeia alimentar (ARAÚJO *et al.*, 2010), podendo ser consumido pelo homem. Assim, os peixes expostos a diferentes formas de Hg estão relacionados a vários efeitos imunotóxicos, prejuízos na resposta imune e alterações nos níveis de citocinas anti-inflamatórias (PINHEIRO *et al.*, 2000). Segundo Lemire e colaboradores (2006), os peixes representam a alimentação básica e a principal fonte de proteínas para populações tradicionais e ribeirinhas, as quais merecem atenção especial por possuir maior probabilidade de exposição a níveis considerados perigosos. Estudos na Amazônia acerca dos níveis de exposição ao Hg datam desde os anos 90, período o qual altas concentrações foram identificadas devido a corrida pela extração do ouro, sendo objeto de preocupação em virtude dos riscos à saúde que este metal poderia provocar a populações expostas (COSTA JUNIOR *et al.*, 2015).

Sendo assim, o uso do disseleneto de difenila (Ph_2Se_2), um composto organosselênico extensivamente utilizado em modelos experimentais de peixes como aditivos de alimentação devido às suas propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras e anti-inflamatórias, trouxe grandes resultados para a proteção dos pescados (MARTINS *et al.*, 2018; MENEZES *et al.*, 2016). De particular interesse para este estudo, Fiuza e colaboradores (2018), revelou que suplementação dietética com 3 mg/kg de Ph_2Se_2 por 30 dias exerce proteção hepática e renal em jundiás (*Rhamdia quelen*) exposto por via intraperitoneal a 1,7 mg/kg de HgCl_2 , mas o possível efeito imunoprotetor efeitos permaneceram desconhecidos. Estudo conduzido por

Doleski e colaboradores (2017), revelou que 5 mg/kg de Ph₂Se₂ (via subcutânea) previne prejuízos imunológicos em camundongos experimentalmente infectados por *Toxoplasma gondii* via efeitos protetores na sinalização purinérgica.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar se a suplementação alimentar com Ph₂Se₂ preveniria o prejuízo nas respostas imunes e inflamatórias provocadas pelo CH₃HgCl via proteção na sinalização purinérgica em órgãos imunes de peixes.

3. METODOLOGIA

Os principais componentes, CH₃HgCl e Ph₂Se₂ foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Uma dieta basal foi formulada e forneceu todos os requisitos nutricionais para a carpa capim. Para preparar uma dieta suplementada, Ph₂Se₂ (3 mg/kg de ração) foi adicionado à dieta basal preparada; esta concentração foi baseada em Fiuza et al. (2018), que demonstraram os efeitos protetores deste princípio ativo em um modelo de envenenamento por Hg usando bagre prateado como modelo experimental.

Setenta e duas carpas capim (10,16 ± 1,09 g; 12,01 ± 1,44 cm; média ± desvio padrão) foram usadas como modelo experimental. Os animais foram mantidos em aquários de 30 L continuamente aerados (água estática) e divididos em quatro grupos (A-D, n = 6 por grupo), com três repetições cada, da seguinte forma: os grupos A e C receberam a dieta basal, enquanto os grupos B e D receberam a dieta basal que continha 3 mg/kg de Ph₂Se₂. Todos os grupos receberam suas dietas experimentais uma vez ao dia, às 14 horas, durante 30 dias consecutivos, proporcional a 5% da biomassa individual total (FIUZA *et al.*, 2018). Após 30 dias, os grupos C e D foram expostos por 96 h a 15 µg/L CH₃HgCl, conforme descrito por Strungaru e colaboradores (2018), em peixe-zebra. A concentração testada pode ser facilmente encontrada no ambiente, pois a concentração de CH₃HgCl em águas espanholas é em torno de 15 a 20 µg/L (BERZAS NEVADO *et al.*, 2003)

Após 96 h de exposição ao CH₃HgCl, o rim da cabeça e o baço de dois juvenis de cada aquário (n = 6 por tratamento) foram coletados sob anestesia natural com eugenol 60 mg/L (GAUSE *et al.*, 2012) seguido de ruptura da medula espinhal, de acordo com as recomendações do Comitê de Ética. A seguir, os tecidos do rim cefálico e do baço foram removidos e dissecados em um prato de vidro com gelo e divididos em duas porções: (1) para avaliação da sinalização

purinérgica nos tecidos e (2) para isolamento de linfócitos para medir a sinalização purinérgica. O rim cefálico e o baço foram homogeneizados (1:10 p/v) com 10 mM Tampão Tris-HCl (pH 7,4) e centrifugado a $2000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises. Linfócitos foram isolados usando Ficoll-Hypaque, segundo Velázquez e colaboradores (2018). Ambos os órgãos foram macerados em 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, colocados em Ficoll-Hypaque e centrifugado a $800 \times g$ por 25 min. A banda de leucócitos foi coletada, lavada duas vezes com PBS e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises.

Atividades de NTPDase e 5'-nucleotidase no homogenato de rim cefálico e baço foram determinados de acordo com Rosemberg e colaboradores (2010), usando um protocolo publicado em detalhes por Baldissera e colaboradores (2018). As atividades enzimáticas foram expressas como nmol de piruvato (Pi) liberado/min/mg de proteína. A atividade de NTPDase em linfócitos do rim cefálico e do baço foram determinadas seguindo o método descrito por Leal e colaboradores (2005), e recentemente descrito em detalhes por Baldissera e colaboradores (2018); as atividades enzimáticas foram expressas em nmol Pi liberado/min/mg de proteína. A atividade da ADA em homogenatos e linfócitos foi medida espectrofotometricamente com base na liberação direta de amônia quando a enzima age sobre a adenosina, conforme relatado anteriormente por Giusti e Gakis (1971) e (BALDISSERA *et al.*, 2018). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína.

A metodologia utilizada no estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (protocolo 8075021218).

4. RESULTADOS

A atividade da NTPDase em tecidos e linfócitos diminuiu significativamente nos peixes expostos ao CH_3HgCl (grupo C) em comparação com o grupo controle (grupo A). A suplementação dietética com Ph_2Se_2 sozinha (grupo B) não afetou significativamente a atividade de NTPDase em homogeneizados de tecido ou linfócitos em comparação com o grupo controle (grupo A). No entanto, a suplementação dietética com Ph_2Se_2 (grupo D) impediu a diminuição da atividade de NTPDase em tecidos e linfócitos observados em peixes expostos a CH_3HgCl (grupo C).

A atividade da NTPDase tecidual e nos linfócitos diminuiu significativamente nos peixes expostos ao CH_3HgCl (grupo C) em comparação com o grupo controle (grupo A). Por si só, a suplementação com Ph_2Se_2 não afetou significativamente a atividade de NTPDase em

tecidos ou linfócitos em comparação com o grupo controle. Por outro lado, a atividade de NTPDase em tecidos e linfócitos foi maior em peixes suplementados com Ph₂Se₂ (grupo D) em comparação com peixes expostos a CH₃HgCl (grupo C), mas permaneceu menor que no grupo controle (grupo A).

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à atividade de 5'-nucleotidase tecidual ou para linfócitos de rim cefálico e baço. A atividade da ADA em tecidos e linfócitos aumentou significativamente nos peixes expostos ao CH₃HgCl (grupo C) em comparação com o grupo controle (grupo A). A suplementação de Ph₂Se₂ sozinha (grupo B) não afetou significativamente a atividade da ADA em homogeneizados de tecido ou linfócitos em comparação com o grupo controle. A suplementação com Ph₂Se₂ (grupo D), no entanto, impediu o aumento da atividade da ADA em tecidos e linfócitos que foi observado em peixes expostos ao CH₃HgCl (grupo C).

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A diminuição da atividade da NTPDase tecidual e linfocítica (para ATP e ADP) após 96 horas de exposição ao CH₃HgCl pode estar ligada a um perfil pró-inflamatório devido à redução da hidrólise de ATP e ADP e ao possível aumento desses compostos no meio extracelular, como observado por Senger e colaboradores (2006) que demonstraram uma inibição dose-dependente na hidrólise de ATP e ADP em membranas cerebrais de peixe-zebra expostas a 0,05 a 1 mM de Hg₂⁺ por 10 min. Além disso, o aumento da atividade tecidual e linfocítica da ADA pode estar relacionada a um perfil pró-inflamatório devido ao aumento da desaminação de Ado e sua consequente diminuição no meio extracelular, uma vez que Ado é um nucleosídeo com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras por meio da supressão de um pró-resposta inflamatória através da interação com o purinereceptor P1 (PASSOS *et al.*, 2018). Em concordância com nossas observações, Abdalla e colaboradores (2012) revelaram que o aumento da atividade da ADA no hipocampo de ratos expostos a 1 ou 4 mg/kg de MeHg favorece um perfil pró-inflamatório devido à diminuição dos níveis de Ado.

Em carpas expostas a CH₃HgCl, a suplementação dietética com 3 mg de Ph₂Se₂/kg de ração, um composto organoselênio com propriedades imunomoduladoras (LEITE *et al.*, 2015) impediu efetivamente a diminuição da atividade da NTPDase e o aumento da atividade da ADA. Doleski *et al.* (2017) revelou que 5 mg/kg de Ph₂Se₂ via subcutânea modulou a sinalização purinérgica no tecido hepático e em linfócitos de camundongos infectados experimentalmente por *T. gondii*, impedindo o aumento da atividade de NTPDase (para ATP e

ADP) e a diminuição da atividade de ADA. Os autores concluíram que o Ph_2Se_2 é um composto que pode prevenir o processo inflamatório porque reduz a inflamação hepática e exibe um efeito imunomodulador nos linfócitos hepáticos. No presente estudo, a suplementação com Ph_2Se_2 modulou a atividade de ADA em tecidos e linfócitos a níveis basais, fenômeno que pode estar relacionado à inibição da desaminação excessiva de Ado em inosina e seu consequente aumento no meio extracelular, suposição que concorda com Sartori e colaboradores (2017). De acordo com esse estudo, 5 mg/kg de Ph_2Se_2 por dia durante 5 dias modula as atividades da ADA hepática e renal em camundongos infectados experimentalmente pelo vírus herpes simplex 2, concluindo que essa modulação reduz a toxicidade hepática e renal causada por infecção.

Nosso estudo sugere que a sinalização purinérgica em órgãos imunes e linfócitos é uma via crucial ligada a efeitos pró-inflamatórios durante a exposição a uma concentração ambientalmente relevante de CH_3HgCl . A suplementação dietética com 3 mg de $\text{Ph}_2\text{Se}_2/\text{kg}$ de ração preveniu todas as alterações causadas por CH_3HgCl e, portanto, pode ser um interessante composto que pode evitar respostas imunes e inflamatórias prejudicadas mediadas pelo CH_3HgCl .

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. H. *et al.* Methylmercury-induced changes in target organs of suckling rat pups. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 64, p. 605-609, 2012.
- ARANTES, C. C. *et al.* Population density, growth and reproduction of arapaima in an Amazonian riverfloodplain. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 19, p. 455-465, 2010.
- ARAÚJO, B. F. *et al.* Distribuição de Hg total e suas associações com diferentes suportes geoquímicos em sedimentos marinhos na margem continental brasileira: Bacia de Campos – Rio de Janeiro. **Quim. Nova**, v.33, p.501-507, 2010.
- BALDISSERA, *et al.* Bioenergetics dysfunction and oxidative damage induced by thiamethoxam exposure as relevant toxicological mechanisms in freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*. **Sci. Total Environ**, v. 636, p. 420-426, 2018.
- BERZAS NEVADO, J. J. *et al.* Distribution of mercury in the aquatic environment at Almadín. **Spain. Environ. Pollut.** v. 122, p. 261-271, 2003.
- COSTA JUNIOR, J. M. F. *et al.* Avaliação dos níveis de exposição ao mercúrio em comunidades ribeirinhas da região do Tapajós. **Rev. Pesq. em Saúde**, v. 14, p. 29-34, 2012.
- CRUZ, C. I. A. *et al.* A sodium alginate bilayer coating incorporated with green propolis extract as a powerful tool to extend *Colossoma macropomum* fillet shelf-life. **Food Chem**, v. 355, p. 129-610, 2021.

DOLESKI, P. H. *et al.* Diphenyl diselenide modulates nucleotidases, reducing inflammatory responses in the liver of *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Purinergic Signal**, v. 13, p. 489–496, 2017.

FERREIRA, M. F. *et al.* Use of energetic substrates after feeding in two Amazon Characidae fish: *Colossoma macropomum* and *Brycon amazonicus*. **Aquaculture Research**, v. 55, p. 4550-4562, 2021.

FIUZA, T. L. *et al.* Effects of diphenyl diselenide diet on a model of mercury poisoning. **Molecular Biology Reports**, v. 45, p. 2631–2639, 2018.

GIUSTI, G.; GAKIS, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine from human serum and tissues. **Enzyme**, v. 12, p. 417–425, 1971.

GRGEC, A. S. Potential risks and health benefits of fish in the diet during the childbearing period: Focus on trace elements and n-3 fatty acid content in commonly consumed fish species from the Adriatic Sea. **Environmental Advances**, v. 8, p. 100-226, 2022.

LEAL, D. B. *et al.* Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1721, p. 9-15, 2005.

LEITE, M. R. *et al.* Swimming exercise and diphenyl diselenide-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats. **Cytokine**, v. 71, p. 119-123, 2015.

LEMIRE, M. *et al.* Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. **Sci Total Environ**, v. 366, p.101-111, 2006.

MARINS, A. T. *et al.* A resposta de biomarcadores integrados confirma o papel antioxidante do disseleneto de difenila contra a atrazina. **Ecotoxicologia e Segurança Ambiental**, v. 151, p. 191–198, 2018.

MENEZES, C. *et al.* Efeito da suplementação da dieta com disseleneto de difenila sobre biomarcadores de estresse oxidativo em duas espécies de peixes de água doce expostos ao inseticida fipronil Fisiol de Peixe. **Bioquim**, v. 42, p. 1357-1368, 2016.

OSMOND AND COLOMBO. The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: Advantages and challenges. **Journal World Aquaculture Society**, v. 50, p. 490–509, 2019.

PASSOS, D. F. *et al.* Adenosine signaling and adenosine deaminase regulation of immune responses: impact on the immunopathogenesis of HIV infection. **Purinergic Signalling**, v. 14, p. 309-314, 2018.

PINHEIRO, M. C. N. *et al.* Avaliação da contaminação mercurial mediante análise do teor de Hg total em amostras de cabelo em comunidades ribeirinhas do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p.181-184, 2000.

ROSEMBERG, D. B. *et al.* NTPDase family in zebrafish: nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 155, p. 230–240, 2010.

SARTORI, G. *et al.* Diphenyl diselenide reduces oxidative stress and toxicity caused by HSV-2 infection in mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, p. 1028-1037, 2017.

STRUNGARU, S. A. *et al.* Acute exposure to methylmercury chloride induces fast changes in swimming performance, cognitive processes and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*) as reference model for fish community. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 47, p. 115-123, 2018.

SENGER, M. R. *et al.* Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology**, v. 226, p. 229-237, 2006.

TINÔCO, A. A. P. *et al.* Avaliação de contaminação por mercúrio em Descoberto, MG. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, p. 305-314, 2010.

UNITED NATIONS. World population prospects: The 2017 revision. New York, United Nations: **Department of Economic and Social Affairs**. Retrieved from. 2017.

VALÁZQUES, J. *et al.* Discovery of immunoglobulin T in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A potential molecular marker to understand mucosal immunity in this species. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 88, p. 124-136, 2018.