

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOLOGIA

COLEOMÓCITOS: CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DO 2,4D E CLOROACETAMIDA

¹ Patrícia Carvalho Rastoldo (IC-UNIRIO); ¹ Roberta Valoura Reimão (IC-UNIRIO), ¹ Patrícia Christina Genázio Pereira (IC-UNIRIO), ¹ Paulo Felliipe da Coneição (Estágio-voluntário), ¹ Sidney Fernandes Sales Junior (Estágio-voluntário), ² Thelma Pavessi (Tecnologista), ¹ Fábio Veríssimo Correia (Orientador).

1- Departamento de Ciências Naturais; Instituto de Biociências; Centro de Ciências Biológicas e da saúde; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2 - Centro de Estudos e Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CAPES, CNPq.

Palavras-chave: Eisenia andrei; contaminante; toxicidade.

INTRODUÇÃO

O fluido celômico da minhoca, uma parte do esqueleto hidrostático, atua como comunicador entre o meio interno e externo, desempenha um papel importante na manutenção de homeostase e contém uma população abundante de células imunocompetentes, celomócitos. Tem sido demonstrado que diferentes poluentes (resíduos orgânicos e inorgânicos) podem perturbar a integridade e as funções dos celomócitos da minhoca, e que estas respostas podem ser utilizados como biomarcadores de estresse sub-letal, química induzida. A medição das respostas aos poluentes com celomócitos in vitro pode fornecer uma poderosa ferramenta para estudos ecotoxicológicos

OBJETIVO

Objetivo deste trabalho foi quantificar e caracterizar células de minhocas exposta ao herbicida 2,4D.

METODOLOGIA

Caracterização celular.

Foram selecionados organismos com peso entre 300-600 mg e clitelo bem desenvolvido, para o procedimento de extrusão com o objetivo de coletar amostras do líquido celômico e posterior avaliação do conteúdo celular conforme técnica adaptada de Eyambe et al (1990). Após a extração uma fração dos celomocitos foi transferida para câmara de Neubauer para determinação da viabilidade e densidade celular. Do mesmo lisado outra fração foi fixada e corada em lâmina microscópica. Ambas as frações foram posteriormente observadas em microscópio óptico (olympus cx31) acoplado ao sistema de captura de imagens. Em seguida, todas as imagens foram submetidas ao Image driving software, para determinação das medidas de raio, comprimento e área das células demarcadas com objetivo de caracterização, padronização e comparação de células de organismos expostos com não expostos a contaminação. Todo procedimento foi executado em triplicata.

Teste de contato.

Para exposição dos organismos ao 2,4D, foi empregado o teste de contato com papel de filtro conforme os procedimentos da norma OECD 207 (1984). Os organismos foram expostos a diferentes concentrações do produto (controle, 0,1; 0,05; 0,02; 0,01 mg.cm⁻²) sendo executado 20 réplicas de cada concentração. Após 24-48-72 horas o experimento foi aberto e verificado, o número de indivíduos vivos, a biomassa, e em seguida 3 organismos de cada concentração eram submetidos aos mesmos procedimentos citados na metodologia acima.

RESULTADOS

Com a contagem do número de indivíduos vivos e mortos nas diferentes concentrações e diferentes tempos de amostragem foi possível determinar o valor de LC50. A LC50 é uma medida padrão da toxicidade que determina a concentração que promove a morte de 50% de indivíduos. Os valores da tabela 1 mostram que com o aumento do tempo de exposição do organismo, menor foi a concentração de efeito.

Tabela 1. Valores de LC50 de organismos expostos a 2,4D em diferentes tempos.

Substâncias	LC50		
	24h	48h	72h
2,4 D (mg)	3,947	1,683	1,245

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

A tabela 2 mostra a percentagem de viabilidade e densidade em relação 2,4D e 72h com o 2,4D. No período de 24h, observa-se que a viabilidade é muito abaixo do que a média padrão, 80%. E a densidade ao contrário, foi mais alta do que o normal. A concentração 0,05 mg.cm⁻² é a que possui maior percentagem com 72%. No tempo de 48h, houve perda de organismo na concentração 0,1mg/cm² e a viabilidade aumento com duas concentrações (controle e 0,02 mg.cm⁻²) chegando a média padrão. Já a densidade não alterou de um período para o outro com muita intensidade. Em 72h teve morte nas concentrações 0,05; 0,02 mg.cm⁻² e controle, restando apenas a concentração 0,01 mg.cm⁻² com sua viabilidade na média-padrão e sua densidade de 1,1x10⁶.

Tabela 2. Dados em percentagem de viabilidade e densidade com 2,4D em relação ao tempo.

Contaminante	Tempo (Horas)	Concentração (mg.cm ⁻²)	Viabilidade (%)	Densidade (10 ⁶)
2,4D	24	0	66,16 ± 8,29	2,2 ± 1,6
		0,1	35,82 ± 12,71	1,3 ± 1,9
		0,05	72,77 ± 8,64	1,5 ± 0,7
		0,02	41,56 ± 8,10	1,5 ± 1,1
		0,01	46,10 ± 9,55	1,0 ± 0,7
	48	0	82,83 ± 6,33	0,5 ± 0,4
		0,1	-	-
		0,05	76,67 ± 12,11	1,0 ± 1,1
		0,02	85,75 ± 9,14	2,0 ± 0,5
		0,01	71,14 ± 6,04	1,7 ± 0,8
	72	0	-	-
		0,1	-	-
		0,05	-	-
		0,02	-	-
		0,01	80,92 ± 7,52	1,1 ± 1,2

Segundo a tabela 3, a concentração de 0,01 mg.cm⁻² de 2,4D em um período de tempo por horas com as medidas de raio, área e comprimento celular em comparação com o controle que no caso são as grandezas sem haver contaminação. Foi observado que o valor do raio da concentração no período de 72h assemelha ao do controle, grandezas como área e comprimento é praticamente a metade do mesmo. No tempo de 24, e 48h as medidas são inferiores.

Tabela 3. Relação de células vista por Neubauer com 2,4D em período de 72h.

Concentração (mg.cm ⁻²)	Tempo (Horas)	Raio (Rad)	Área (A=πR ²)	Comprimento (C=2πR)
0,01	24	16,61 ± 2,96	891,49 ± 303,30	104,33 ± 18,65
	48	17,51 ± 2,51	981,31 ± 256,30	110,34 ± 15,80
	72	20,15 ± 2,25	1289,45 ± 273,76	126,57 ± 14,18
Controle	-	23,61 ± 2,60	1773,09 ± 379,63	148,37 ± 16,33

Foi observado na tabela 4 os valores referentes a contagem de células com o contaminante, 2,4D, no período de 48h. Foi observado que houve perda de organismo na concentração de 0,1mg.cm⁻². A média da maiores das células por concentração caíram, porem nas concentrações 0,2 mg.cm⁻² e 0,01 mg.cm⁻² a célula eleócito não houve mudança de um período para o outro. Em relação a biomassa, foi visto que houve redução, o mínimo passou a ser 0,29 g na concentração 0,02 mg.cm⁻².

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Tabela 4. Relação entre as diferentes células no período de 48h de exposição ao contaminante 2,4D.

Concentrações (mg.cm ⁻²)	Biomassa (g)	Eleocito	Amoe.Hialino	Amoe.Granular
0	0,34 ± 0,02	78 ± 1,79	1 ± 0,89	21 ± 1,90
0,1	-	-	-	-
0,05	0,35 ± 0,06	77,17 ± 3,54	0,67 ± 0,82	22,17 ± 3,19
0,02	0,29 ± 0,05	80,5 ± 3,78	0,5 ± 0,84	19 ± 3,22
0,01	0,35 ± 0,05	80,67 ± 3,78	1,17 ± 0,98	18,17 ± 5,00

A tabela 5 apresenta os valores referentes a contagem de células com o contaminante, cloroacetamida, no período de 48h. Em todas as concentrações o que nota-se é um declínio de células eleócito e um aumento de células de amebócito hialino. Tendo amebócito granular sem alteração aparente. A biomassa dos organismos têm um acréscimo e passa ter um mínimo de 0,34 g. A proporção de célula do tipo amebócito granular e hialino em 2,4D é inversamente proporcional aos de cloroacetamida. Na tabela 6 demonstra a porcentagem de viabilidade e densidade em relação 24,48 e 72h com o cloroacetamida. No período de 24h a viabilidade das concentrações tiveram seu mínimo e máximo respectivamente em 75% a 84%, não obtendo muita diferença com a média-padrão que é de 80%. E a densidade variando de 0,1 a 2,1x10⁶.

No tempo de 48h, a viabilidade de todas as concentrações diminuíram, tendo a concentração de 0,001 mg.cm⁻² com maior baixa de decréscimo, com 70% de viabilidade. A densidade abaixou seu máximo tendo entre 0,1 a 1,4x10⁶. Em 72h, houve perda dos organismos da concentração 0,01 mg.cm⁻². E de forma sequencial em relação ao tempo, a viabilidade e densidade reduziu. A concentração 0,001 mg.cm⁻² obteve viabilidade e densidade maior do que a do controle. Comparando com o 2,4D, foi observado que a viabilidade do cloroacetamida diminui de acordo com o período, ao contrário do que ocorre.

Tabela 5. Relação entre as diferentes células no período de 48h de exposição ao contaminante cloroacetamida.

Concentrações (mg.cm ⁻²)	Biomassa (g)	Eleocito	Amoe.Hialino	Amoe.Granular
0	37 ± 0,08	74,5 ± 2,12	23 ± 2,83	2 ± 0,71
0,1	-	-	-	-
0,01	0,4	70 ± 2,83	28,50 ± 4,95	1,50 ± 2,12
0,001	34 ± 0,07	73,17 ± 6,97	23 ± 7,10	3,83 ± 1,17

Tabela 6. Dados em porcentagem de viabilidade e densidade com cloroacetamida em relação ao tempo.

Contaminante	Tempo (Horas)	Concentração (mg.cm ⁻²)	Viabilidade (%)	Densidade (10 ⁶)
CLOROACETAMIDA	24	0	82,64 ± 12,00	0,3 ± 0,1
		0,1	-	-
		0,01	75,01 ± 11,99	1,5 ± 0,4
		0,001	84,38 ± 5,31	2,1 ± 0,2
	48	0	70,62 ± 4,63	1,4 ± 1,1
		0,1	-	-
		0,01	74,66 ± 2,23	0,3
		0,001	70,19 ± 12,19	1,0 ± 0,2
	72	0	66,60 ± 7,29	1,0 ± 0,4
		0,1	-	-
		0,01	-	-
		0,001	69,86 ± 8,63	0,3 ± 0,1

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Pode-se observar na figura 1 três tipos de células: Letra A, eleócito, célula na qual tem sua forma arredondada assim como seu núcleo que se encontra no centro da mesma. Letra B, amebócito granular, possui aspecto circular alterado conforme também seu núcleo, encontrado nas extremidades da mesma. Letra C, amebócito hialino, formato circular com tipos de “redes” interligando a célula e letra D são as células vista por Neubauer.

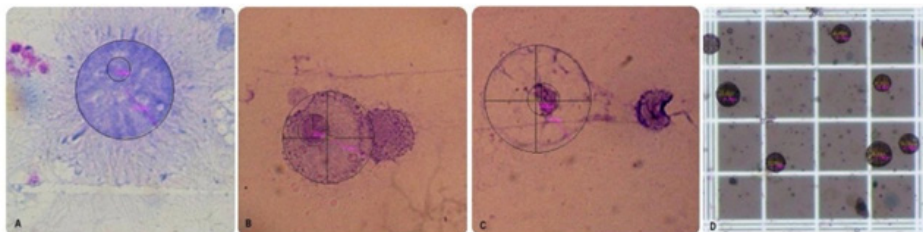


Figura 1. Imagens das células vista em Neubauer e seus três tipos visualizadas por microscopia demarcadas pelo software. (A) Eleócito, (B) Amebócito Granular, (C) Amebócito Hialino e (D) Neubauer.

CONCLUSÃO

A concentração letal diminuiu com o tempo de exposição. Os resultados de viabilidade celular aumentam com o tempo de exposição ao 2,4D, o mesmo não ocorre com o cloroacetamida. Os valores de densidade não são alterados em nenhum dos produtos de exposição. As medidas de raio, área e comprimento celular não apresentam diferenças significativas. Os diferentes produtos promoveram proporções diferentes dos tipos de células.

REFERÊNCIAS

Eyambe, G. S., A. J. Goven, L. C. Fitzpatrick, B. J. Venables & E. L. Cooper (1991) A noninvasive technique for sequential collection of earthworm (lumbricusterrestris) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory Animals*, 25, 61-67.
OECD. 1984. Guideline for the testing of chemicals.