



OLIGOQUETAS COMO BIOINDICADORES E MODELO PARA ESTUDO DE ESTRESSE CELULAR CAUSADO POR EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO¹

Juliana Furlanetto Pinheiro², Maria Eduarda Todendi de Bragas³, Isadora Sulzbacher Ouriques, Pauline Brendler Goettens Fiorin⁵, Thiago Gomes Heck^{5,6}

¹ Pesquisa desenvolvida na Unijuí; financiado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - PROBIC/PROBITI-FAPERGS .CNPq proc. 405546/2023-8

² Bolsista FAPERGS; estudante do curso Medicina da UNIJUÍ.

³ Bolsista CNPq E.M estudante do Ensino médio da Escola Técnica Estadual 25 de Julho.

⁴ Estudante do curso de Biomedicina da UNIJUÍ. Voluntária no Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF).

⁵ PPG em Atenção Integral à Saúde.

⁶ Professor orientador da UNIJUÍ/PPG em Atenção Integral à Saúde.

INTRODUÇÃO

A ampla utilização no mundo dos Herbicidas à Base de Glifosato (HBGs) se dá por contribuir no controle das plantas daninhas (Sharma et al, 2019; Maggi et al 2020). No solo, os HBGs podem passar pelos processos de infiltração e adsorção à matéria orgânica, assim, atingindo, a fauna edáfica. Em relação aos seres vivos dessa fauna, destaca-se as minhocas (oligoquetas), as quais são bioindicadores disso, pois são sensíveis às alterações ambientais, inclusive à presença de agrotóxicos no solo (Sadegh-Zadeh; Wahid; Jalili, 2017).

As minhocas também são consideradas importantes modelo no estudo comparativo do sistema imunológico, como Cooper Edwin L. 1969 demonstrou ao analisar a atividade dos celomócitos na rejeição de aloenxertos e xenoenxertos. Atualmente, sabe-se da responsabilidade dos celomócitos na depuração e na defesa imunológica das oligoquetas e, que a exposição a poluentes pode prejudicar a sua integridade e funcionalidade (Engelmann et al, 2011; Gautam et al., 2020). No entanto, os efeitos dos HBGs no sistema imune de minhocas precisam ser melhor elucidados. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar se a exposição a concentrações agrônômicas de HBG induzem alterações na contagem total, na contagem diferencial, na densidade e na viabilidade de celomócitos de minhocas.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 144 minhocas adultas da espécie *Eisenia andrei*, com massa corporal entre 0,3 e 0,4g, coletadas diretamente da vermicomposteira do Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUÍ. Os animais foram submetidos a quatro rodas experimentais do Teste de Toxicidade Aguda, divididos nos seguintes grupos experimentais: Controle (CTRL), solo que recebeu apenas água; Glifosato 1,5 (GLY 1,5), solo exposto ao HBG em dosagem equivalente a 1,5L/ha - a metade da dosagem recomendada pelo fabricante (3L/100L de água



- vide bula Monsanto®); Glifosato 3 (GLY 3), solo exposto ao HBG em dosagem equivalente a 3L/ha; e Glifosato 6 (GLY 6), exposto ao HBG na dosagem de 6L/ha, o dobro da dosagem recomendada. A cada rodada, os grupos experimentais tiveram 6 animais cada.

Durante os experimentos, os animais foram colocados em potes plásticos, que constituíram as Unidades Experimentais (UEs). Cada UE continha 95% de solo livre de matéria orgânica e 5% de erva-mate. A umidade do composto foi ajustada para 60%. Antes do período experimental, as minhocas foram aclimatadas durante 24 horas, em que não receberam nenhum tratamento. Após o período de aclimação, os animais foram coletados das UEs e distribuídos em novas UEs, contendo composto idêntico ao anterior, no entanto, expostas ao HBG nas respectivas concentrações: GLY 1,5 - 0,9 mL de HBG em 60 mL de água da torneira, correspondendo a 1,5L/ha (1,5 L/100 L de água); GLY 3 - 1,8 mL de HBG em 60 mL de água da torneira, correspondendo a 3L/ha (3 L/100 L de água); e GLY 6 - 3,6 mL de HBG em 60 mL de água da torneira, correspondendo a 6L/ha (6 L/100 L de água). O grupo CTRL recebeu apenas 60 mL de água. O período experimental foi de 48 horas.

Ao final do período experimental, os animais foram retirados das UEs e o fluido celômico foi coletado pelo método de extrusão não-invasiva adaptado de Eyambe (1991), que consiste na coleta do fluido por meio do contato de cada minhoca com 1mL de solução de 5% etanol e 95% solução salina (NaCl 0,9%) suplementada com EDTA (2,5 mg/ml) com um pH 7,3, durante 3 minutos, após isso era adicionado 1mL de LBSS, para encerrar a extrusão. Ao final da extrusão, as minhocas foram eutanasiadas.

Para a contagem total de células, contagem diferencial, análise da viabilidade celular, da densidade celular, foram diluídos 30 µL de fluido celômico em 30 µL de Trypan Blue e analisados em câmara de Neubauer® em microscópio óptico.

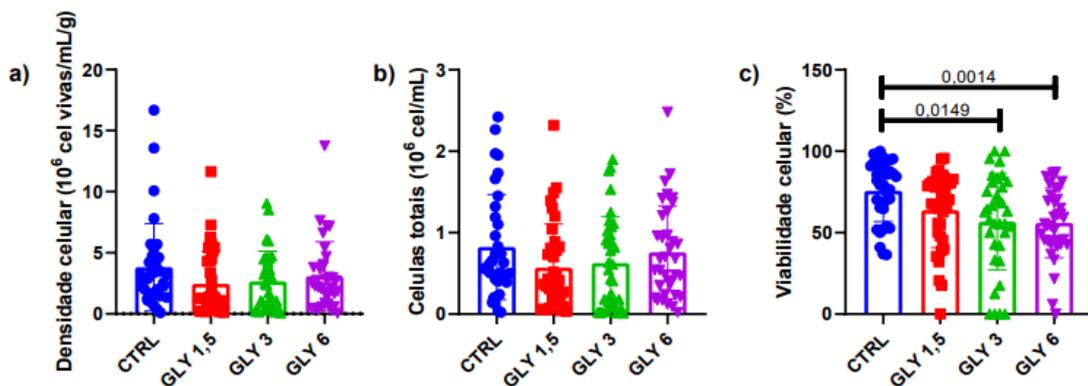
A análise estatística foi realizada no software Graphpad Prism 8.0.1. Os resultados foram apresentados em média ± desvio padrão. A normalidade dos dados foi checada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparar os diferentes grupos, os dados de viabilidade celular, a contagem total e densidade celular foram analisados por meio do Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. A contagem diferencial, ambos os grupos foram submetidos a um Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida do Teste de Múltiplas Comparações de Tukey. Foi considerado significativo $P < 0,05$.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificamos que oligoquetas expostas às maiores dosagem de HBG (grupo GLY6 e GLY 3) tiveram redução na viabilidade celular ($P=0,0014$ e $P= 0,0149$, respectivamente) (Figura 1c). Todavia, não houve alteração na contagem total ($P= 0,1884$) e nem na densidade dos celomócitos ($P=0,1412$) (Figura 1a e 1b).

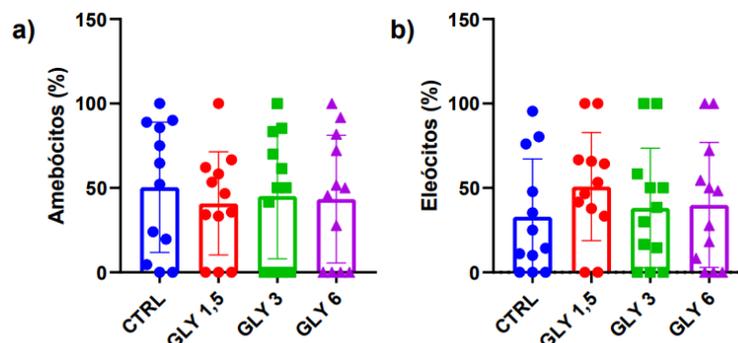
Figura 1- Efeitos do herbicida à base de glifosato na densidade, na contagem total de células e na viabilidade dos celomócitos de oligoquetas.



Fonte:Elaborado pelos autores. CTRL: grupo controle; GLY 1,5, GLY 3 e GLY 6, grupos expostos ao HBG nas concentrações de 1,5L/ha, 3L/ha e 6L/ha, respectivamente. a) Densidade celular. $P=0,1412$. b) Contagem total dos celomócitos. $P=0,1884$. c) Viabilidade dos celomócitos. $P = 0,0014$ em CTRL vs GLY 6 e $P =0,0149$ CTRL vs GLY 3

Ao realizar a contagem diferencial dos celomócitos das minhocas expostas às diferentes dosagem de HBG, não encontramos dissimilitude entre os grupos tanto na proporção de amebócitos ($P= 0,9299$) quanto na proporção de eleócitos ($P= 0,6438$) da amostra.

Figura 2- Efeitos do herbicida à base de glifosato na contagem diferencial de celomócitos de oligoquetas.

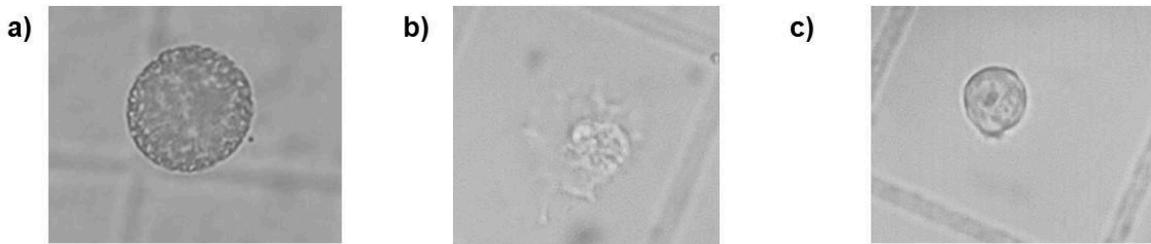


Fonte: Elaborado pelos autores. CTRL: grupo controle; GLY 1,5, GLY 3 e GLY 6, grupos expostos ao HBG nas concentrações de 1,5L/ha, 3L/ha e 6L/ha, respectivamente. a) Contagem diferencial (amebócitos). $P= 0,9299$. b) Contagem diferencial (eleócitos). $P=0,6438$.



Conforme estudo comparativo realizado por Cooper, Edwin L. 2006, a proporção de amebócitos e eleócito encontrados em uma amostra de uma população de minhocas que não sofreram a exposição a um solo contaminado, é de 1:1. Ademais, perceberam que a contagem total de celomócitos de oligoquetas expostas a um solo contaminado por até 72 horas se mantém constante; porém, a proporção de amebócitos é afetada. Entretanto, no nosso estudo, não foi possível observarmos tais alterações na proporção de amebócito no presente momento.

Figura 3- Celomócitos de oligoquetas (*E. andrei*) visualizado em microscopia óptica.



Fonte: Elaborado pelos autores. Três tipos diferentes de celomócitos de oligoquetas distinguidos em: a) Eleócitos b) Amebócito hialino c) Amebócito granular.

Ao analisar separadamente os celomócitos, podemos destacar suas principais funções dentro do organismo das minhocas, sendo: os eleócitos, células grandes e preenchidas com cloragossomos (grandes grânulos contendo fluoróforo), que são derivados do tecido cloragógeno o qual recobre o canal alimentar e, por isso, são responsáveis pela função acessória e nutritiva, assim, armazenando glicogênio e lipídeos; e os amebócitos, que são células de defesa das minhocas, sendo subdivididos granulócitos e hialinos, os quais são diferenciados pela presença de grânulos no seu citoplasma ou pela aparência típica de “ovo frito” pelo seu núcleo centralizado, respectivamente (Prochazkova, et al, 2020; Bilej, et al, 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição aos HBGs pode afetar os organismos do ambiente edáfico. Destaca-se nesse estudo, o comprometimento das minhocas pela redução da viabilidade celular de celomócitos. Estes dados suportam o uso de oligoquetas tanto como bioindicadores de poluentes ambientais quanto como modelos alternativos de investigação de vias de estresse celular e comprometimento imunológico.

Palavras-chave: Oligoquetas; Agrotóxico; Celomócitos

