

## Avaliação da radiosensibilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama

Evaluation of radiosensitivity hemocytes of *Biomphalaria glabrata* exposed to gamma radiation

L. R. S. Silva<sup>1</sup>; E. B. Silva<sup>1,2</sup>; A. J. Amaral<sup>1</sup>; F. F. Amâncio<sup>3</sup>; A. M. M. A. Melo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540, Recife-PE, Brasil

<sup>2</sup>Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540, Recife-PE, Brasil

luannaribeiro\_lua@hotmail.com

(Recebido em 30 de março de 2013; aceite em 13 de maio de 2013)

Os moluscos *Biomphalaria glabrata* apresentam características que permitem que estes sejam apontados como um modelo animal ideal para monitoramento de ambientes expostos a agentes físicos e químicos. O presente trabalho avaliou o efeito da radiação ionizante de Cobalto-60 em hemócitos, presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, com o objetivo de utilizar estas células como indicadores da presença de radiação em ambientes aquáticos. Os moluscos foram divididos em cinco grupos: um controle e quatro submetidos às doses de 25, 35, 45 e 55 Gy de radiação gama. Após 48 horas da irradiação, a hemolinfa dos moluscos foi coletada e as lâminas foram preparadas e coradas com Giemsa para análise em microscópio óptico. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA e teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Os resultados demonstraram que o número total de células após a irradiação baixou em comparação ao controle, exceto na dose de 55 Gy. Durante a análise dos resultados, foram observadas alterações morfológicas em hemócitos de moluscos submetidos às doses de 35, 45 e 55 Gy. Estas modificações consistiram de formação de núcleo bilobulados e pontes nucleoplasmáticas. Outra alteração celular foi exclusivamente observada na exposição de 55 Gy, onde os hemócitos apresentaram núcleos disformes e vacuolização no citoplasma, sugestivo de apoptose celular. Conclui-se que os hemócitos são sensíveis à radiação e podem ser usados como indicadores da presença de altas doses de radiação ionizante em ambientes aquáticos.

Palavras-chave: hemócitos; radioecologia; *Biomphalaria*

The mollusc *Biomphalaria glabrata* have characteristics that allow them to be identified as an animal model ideal for monitoring areas exposed to chemical agents and physical. This study evaluated the effect of ionizing radiation from Cobalt-60 in haemocytes present in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*, with the goal of using these cells as indicators of the presence of radiation in aquatic environments. The mollusks were divided into five groups: one control and four subjected doses of 25, 35, 45 and 55 Gy of gamma radiation. After 48 hours of irradiation, the clam hemolymph was collected and slides were prepared and stained with Giemsa for analyses under a light microscope. Statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey's test,  $p < 0.05$ . The results showed that the total number of cells after irradiation reduced compared to control except at a dose of 55 Gy. During data analysis, morphological changes were observed in haemocytes of mollusks subjected to doses of 35, 45 and 55 Gy. These modifications consisted of nucleus bilobulated and nucleoplasmatic bridges. Another change was exclusively observed in the cellular exposure of 55 Gy, where hemocytes showed misshapen nuclei and cytoplasm vacuolization, suggestive of apoptosis. It is concluded that hemocytes are sensitive to radiation and can be used as indicators of the presence of high doses of ionizing radiation in aquatic environments.

Keywords: hemocytes; radioecology; *Biomphalaria*

## 1. INTRODUÇÃO

Para o estabelecimento da condição homeostática em ambientes naturais é necessário que seja realizado monitoramento destas áreas para possibilitar tomada de ações corretivas quando necessário [1]. Entretanto, O monitoramento e a avaliação do risco dos ambientes impactados não podem ser baseados exclusivamente em análises químicas de amostras ambientais, pois estas análises não são apropriadas na indicação e predição dos efeitos deletérios causados por contaminantes e por agentes físicos, como a radiação ionizante, na biota [2,3].

Desta forma, para avaliar os impactos de poluentes presentes no ambiente, é pertinente que sejam mensurados os efeitos que estes agentes causam nos organismos vivos destes ecossistemas, por meio do biomonitoramento ambiental [4]. O biomonitoramento consiste na análise das respostas de organismos vivos as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antropogênicas [5].

Considerando o ambiente aquático, tem-se que os moluscos *Biomphalaria glabrata*, devido às suas características biológicas e ambientais, além da ampla distribuição geográfica e interferência sobre a saúde humana, como vetor intermediário da esquistossomose mansônica, tem se apresentado como ótimo modelo experimental, possibilitando a avaliação de efeitos produzidos por agentes físicos e químicos no ambiente, além de viabilizar a padronização de metodologias de controle populacional, ou como bioindicadores e biomarcadores de interferentes ambientais [6,7,8].

Alguns trabalhos apresentados na literatura utilizam moluscos em técnicas que têm como base a avaliação das alterações ocorridas em hemócitos, células circundantes presentes na hemolinfa [9,10]. Essas alterações geralmente decorrentes da ação de agentes químicos, que causam danos no DNA, como aneuploidias.

No caso da radiação ionizante, os efeitos na célula se traduzem em mudanças ocorridas durante a duplicação ou no reparo de danos no DNA. O DNA está sujeito à basicamente dois tipos de danos radioinduzidos: mutações gênicas e quebras do DNA (agentes clastogênicos), acarretando falhas na divisão celular. Isto pode levar à morte celular ou a efeitos variados, mesmo depois de vários ciclos mitóticos [11].

Entre os danos que a radiação ionizante pode causar nas células, tem-se a formação de dicêntricos, [12]. Essa aberração pode acarretar formação de pontes nucleoplasmáticas (NPBs), que ocorre entre os núcleos de células filhas, e podem ser visualizadas em microscopia. Este tipo de aberração ocorre devido à formação de cromossomos dicêntricos, quando os dois centrômeros são puxados para lados opostos da célula na anáfase (fase da divisão celular), resultando na formação da ponte nucleoplasmática [13]. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da radiação ionizante de Cobalto-60 em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, bem como, propor uma nova metodologia de monitoramento de ambientes aquáticos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Seleção dos Animais

Foram utilizados moluscos *Biomphalaria glabrata* (melânicos) oriundos de São Lourenço da Mata – PE e mantidos no moluscário do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram selecionados 50 animais de acordo com os seguintes critérios: Adulto jovens, sexualmente maduros, diâmetro da concha entre 10 a 14 mm e idade mínima de 2 meses.

### 2.2. Irradiação de Moluscos Adultos

Os moluscos selecionados foram irradiados na fonte de  $^{60}\text{Co}$  Gammacell® (taxa de dose de 6,912 kGy/h) do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE/Brasil). Foram utilizadas as doses de: 25, 35, 45 e 55 Gy e o controle não irradiado. Para cada dose foram realizadas cinco repetições. Foram utilizados 10 animais para cada dose de radiação.

### 2.3. Preparação das lâminas.

Foi coletada hemolinfa de cada molusco *Biomphalaria glabrata* utilizado no estudo. A hemolinfa foi coletada por meio da estimulação sucessiva da região podal do molusco. Após a estimulação há liberação da hemolinfa, sendo esta coletada imediatamente com o auxílio de uma micropipeta.

Após a coleta, foi gotejado em cada lâmina de microscopia 0,1 mL da hemolinfa de cada animal e, em seguida, foi adicionado 0,1mL de uma solução de Ringer em EDTA a 10 mM. As lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida. Decorrido o tempo de espera, as células foram fixadas com uma solução de glutaraldeído a 1% com Ringer, por 5 minutos.

Posteriormente, as células foram enxaguadas com Ringer e coradas com solução de Giemsa a 5% por cinco minutos. Após esse processo, as lâminas foram lavadas e secadas em temperatura ambiente e levadas para serem analisadas em microscópio óptico (Medilux) com aumento de 100x.

### 2.4. Contagem das células e análises morfológicas

Para as contagens de células foram preparadas lâminas como se segue: 5 animais foram utilizados para a preparação de cinco lâminas, uma para cada animal. As lâminas foram contadas e analisadas em sua totalidade e o número total de hemócitos foram registrados em planilhas. A morfologia dos hemócitos foram analisadas e registradas em microscópio óptico (Leica CW4000).

### 2.5. Análise estatística

As comparações estatísticas entre os números de hemócitos, por dose de radiação, foram realizadas utilizando a ANOVA e o teste de Tukey com nível de significância de 5% e  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os hemócitos presentes nas amostras da hemolinfa coletadas de *Biomphalaria glabrata* expostos e não expostos a alta dose de radiação gama  $^{60}\text{Co}$  foram analisados quanto a radiosensibilidade.

Pode-se observar na Tabela 1, o número total de hemócitos originários dos moluscos *B. glabrata* expostos as doses de 0 (controle não irradiado); 25; 35; 45 e 55 Gy de radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ .

Tabela 1: Hemócitos originários dos moluscos irradiados e não irradiados.

Dose (Gy)	Número total de células	Número médio de células
0	5042	1008
25	4442	888,4
35	3334	666,8
45	4799	959,8
55	5678	1136

Conforme se pode observar pela Tabela 1, as quantidades de hemócitos dos animais irradiados com as doses de 25, 35 e 45 Gy apresentaram uma diminuição quando comparados ao grupo controle (0 Gy), sendo a hemolinfa dos moluscos irradiados com dose de 35 Gy a que apresentou o menor número de células por lâminas analisadas ( $\geq 1000$  por lâminas). A hemolinfa dos animais expostos à dose de 55 Gy apresentou aumento do número de hemócitos em relação aos demais grupos experimentais e controle. O teste estatístico utilizando a ANOVA

mostra que as médias entre o número de células para doses de 35 e 55 Gy são significativamente diferentes entre si para o teste utilizado.

A comparação da radiosensibilidade de diferentes linhagens celulares indica que as células que se dividem rapidamente são mais radiosensíveis que as de reprodução lenta (lei de Bergonié e Tribondeau), embora esta regra tenha exceções (linfócitos e alguns melanomas). Quando se analisa a radiosensibilidade dos hemócitos de *B. glabrata*, pode-se verificar que todos os grupos experimentais mostraram alterações no número de células e alterações morfológicas. Estas modificações seguem o princípio da lei mencionada anteriormente.

Durante a análise dos resultados foram observadas diferentes alterações morfológicas nos hemócitos dos moluscos submetidos às doses de 35, 45 e 55 Gy de radiação gama. Estas modificações consistem na formação de núcleo bilobulado e pontes nucleoplasmáticas, como vistos na Figura 1.

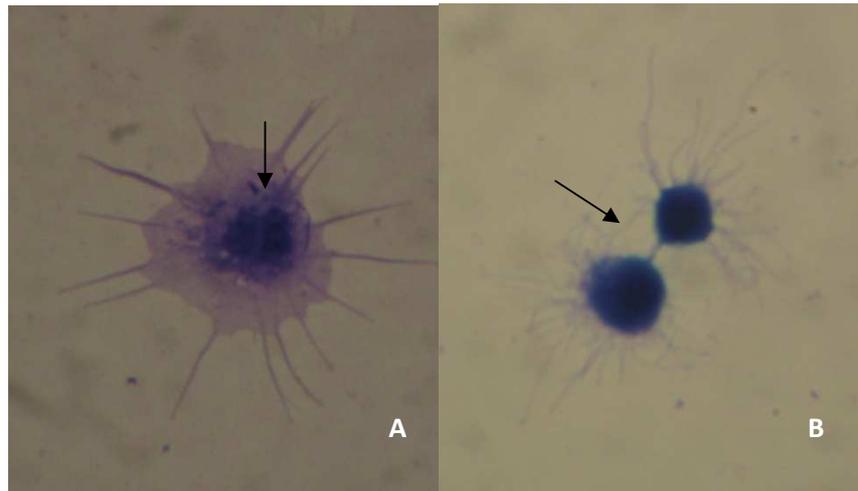


Figura 1: Alterações encontrados na hemolinfa de *B. glabrata* irradiados nas doses de 35, 45 e 55 Gy. (A) Núcleo bilobulado; (B) pontes nucleoplasmáticas.

Experimentos realizados por Zafalon-Silva [14], com peixes dulcícolas da espécie *Astyanax* spp., Teleostei: Characidae expostos a poluentes presentes nas águas do Arroio Padre Doutor no Rio de Janeiro, demonstraram que as células eritrocitárias (células circundantes), presentes no sangue periférico destes peixes, apresentaram núcleo bilobulado, semelhantes às células encontradas no nosso trabalho, indicando que esse tipo de alteração é decorrente da ação de agentes poluentes.

Fenech [13] descreveu a formação de pontes nucleoplasmáticas em linfócitos humanos, originadas provavelmente quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para pólos opostos durante a anáfase. Neste caso, o DNA resultante da ponte é recoberto pelo envoltório nuclear. Essa alteração celular descrita pelo autor pode ter sido o mesmo fator que acarretou a formação de pontes nucleoplasmáticas nos hemócitos de *B. glabrata*, pois a formação de dicêntricos é um evento radioinduzido.

Outra alteração celular foi exclusivamente observada durante a análise microscópica dos hemócitos originários dos caramujos expostos à dose de 55 Gy. Os hemócitos apresentaram núcleo disforme e inúmeros vacúolos no citoplasma (Figura 2).

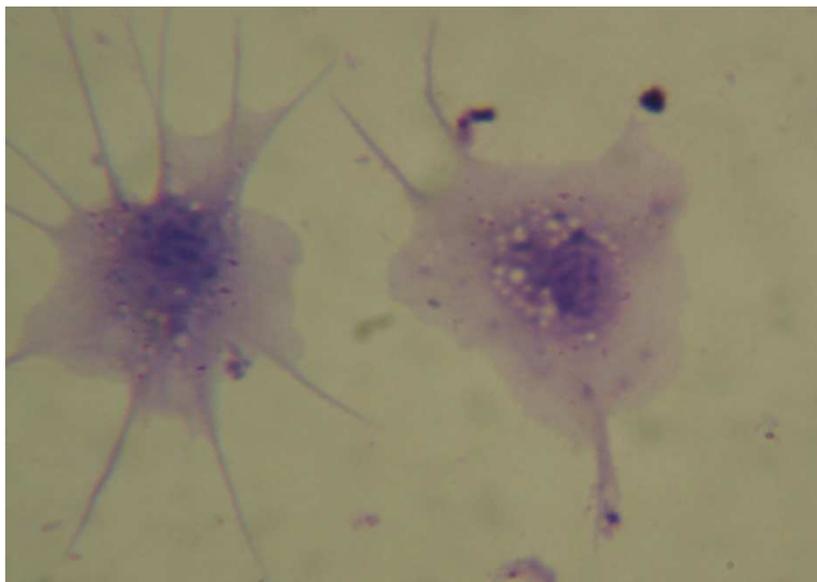


Figura 2: Alterações em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* submetidos a 55 Gy de radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ .

Estas características são sugestivas de indução de apoptose celular. Estudos realizados por Pavlica [9] com bivalve (*D. polymorpha*) e o gastropoda (*P. corneus*) expostos ao pentaclorofenol (PCP) nas concentrações de 450 e 600  $\mu\text{g/l}$ , também detectou células com as mesmas características, sugerindo, também, que se tratava de apoptose celular. Pavlica (2000) sugeriu que a apoptose dos hemócitos ocorreu devido à ação do PCP inibindo as bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sabe-se que uma das causas da apoptose está ligada aos níveis de cálcio dentro da célula [15,16].

O estímulo para apoptose radioinduzida parece estar relacionado ao número de quebras produzidas no DNA, a taxa com que elas ocorrem e a rapidez e eficiência do sistema de reparo [17]. Presumindo que o DNA seja o alvo inicial para apoptose radioinduzida, a resposta celular ao dano na forma de reparo do DNA pode levar à morte celular [18,19]. Desta forma, sugere-se que a apoptose surgida nos hemócitos irradiados ocorreu devido a ação da radiação sobre o DNA da célula.

As diversas alterações nucleares citadas, não foram os únicos achados experimentais neste trabalho. Observa-se também que a radiação ionizante induziu outras alterações no DNA das células, como o aparecimento de micronúcleos.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os hemócitos de *Biomphalaria glabrata* são radiosensíveis e, portanto, podem ser utilizados como indicador da ação de altas doses de radiação ionizante em ambientes aquáticos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Gamalab do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco pelo acesso à fonte de  $^{60}\text{Co}$ . Ao Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE), ao Grupo de Radioproteção e Radioecologia-GERAR.

- 
1. MONSERRAT, J.M.; MARTINEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.; PINHO, G.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology, v. 146, n.1-2,

- p. 221-34. (2007).
2. BARSIENE, J.; LEHTONEN, K.K.; KOEHLER, A.; BROEG, K.; VUORINEN, P.J.; LANG, T.; PEMPKOWIAK, J.; SYVOKIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; REPECKA, R.; VUONTISJARVI, H. & KOPECKA J. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Bütinge area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, v: 53; p 422-436. (2006).
  3. CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, v 247(2-3):p 295-311. (2000).
  4. WELLS, P.G.; DEPLEDGE, M.H.; BUTLER, J.N.; MANOCK, J.J. ; KNAP, A.H. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, v. 42, n.10: p. 799-804. (2001).
  5. BUSS, F. D.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L.; Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios, *Caderno de saúde pública*, v. 19, nº 2, p 465-473, (2003).
  6. ESTEVAM, E. C.; NAKANO, E.; KAWANO, T.; PEREIRA, C. A. B.; AMANCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Dominant lethal effects of 2,4-D in *Biomphalaria glabrata*. *Mutation Research*, London. v. 611, n. 1-2, p. 83-88. (2006).
  7. CANTINHA, R. S.; BORRELY, S. I.; NAKANO, E.; AMARAL, A.; SILVA, L. R. S.; MELO, A. M. M. A. Effects of high dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria Glabrata*. *Int. J. Low. Radiation*, Vol. 7, No.4 pp. 245 - 252, (2010).
  8. TALLARICO, L. F.; OKAZAKI, K.; KAWANO, T; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E.. Dominant lethal effect of <sup>60</sup>Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). *Mutation Research*, v. 561, p. 139-145. (2004)
  9. PAVLICA, M., KLOBUCAR, G. I. V. M, VETMA, N., ERBEN, R., PAPES, D., Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutation Research*, v. 465; p. 145 – 150, (2000).
  10. VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P.; DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants; *Mutation Research* v. 605, p. 78–86, (2006).
  11. SABATIER, L.; LEBEAU, J.; DUTRILLAUX, B ; Radiation-induced carcinogenesis: individual sensitivity and genomic instability. *Radiation and Environmental Biophysics*, v. 34, n.4, p.293-232, (1995).
  12. FERNANDES, T. S.; LLOYD, D.; AMARAL. A; Biodosimetry for dose assessment of partial-body exposure: a methodological improvement; *Brazilian Archives of Biology and Technology*; v. 51, p.97-102, (2008).
  13. FENECH, M. The micronucleus technique. *Mutation Research*. v. 455, p. 81-95. (2000).
  14. ZAFALON-SILVA, B.; BOBROWSKI, V. L.; Anormalidades nucleares eritrocitárias como biomarcador da qualidade da água do arroio padre doutor; XVII Congresso de iniciação científica, x Encontro de pós-graduação, (2008).
  15. FAWTHROP, D.J.; BOOBIS, A.R.; DAVIES, D.S.; Mechanisms of cell death, *Archives of Toxicology*. v. 64. p. 437–444, (1991).
  16. TRUMP, B.F.; Characteristics and mechanisms of cell injury and cell death: the role of wCa2q xi , *Marine Environmental Research*. v. 42, n.1–4, p. 57–63, (1996).
  17. CARSON, D. A.; SETA, S.; WASSON, D.B. & CARRERA, C. J., DNA shand breaks NAD nnetabolism, and programmed cell death. *Esperimental Cell Research*. v. 16, n. 4, p. 273-281, (1986).
  18. STORY, M. D.; STEPHENS, L. C ; TOMASOVIC, S. P. & MEYN, R. E., A role for calcium in regulating apoptosis in rat thymocytes irradiated *in vitro*. *International Journal of Radiation Biology.*, v. 61, n. 2: p. 243-251, (1992).
  19. KANE, K. S. & MAYTIN, E. V., Ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes in murine skin Is reduced by mild local hyperthermia. *Journal of Investigative Dermatology*, v.104, n. 1, p. 62-67, (1995).