

PUC-Campinas

EESC USP

Comitês PCJ

APRESENTAM:

SUSTENTARE & WIPIS2023

WORKSHOP INTERNACIONAL

SUSTENTABILIDADE, INDICADORES E GESTÃO
DE RECURSOS HÍDRICOS



22/11

evento

23/11

100% online

24/11

e gratuito

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE COLORAÇÃO COM GIEMSA EM ESFREGAÇO SANGUÍNEO DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE GENOTOXICIDADE

Anne Karolyne Vieira do Nascimento¹; Bruna Santos da Silva²; Dennis Fabio Silva Lima³;
Fabíola Franklin de Medeiros⁴; Gabrielly Soares da Silva⁵; Lethícia Lima Sousa Medeiros⁶;
Natanael Francisco dos Santos⁷; Raphael Ferreira Ordonho⁸; Severino Irlândeson da Silva⁹;
Thyago Araújo Gurjão¹⁰

Medicina Veterinária, Faculdade Rebouças de Campina Grande, Campina Grande, Paraíba, Brasil

¹annek.vieiranas@gmail.com; ²bruna.santoos100@gmail.com; ³drdennisfabio@gmail.com;

⁴vet.fabiolafranklin@gmail.com; ⁵vetgabriellycontato@gmail.com; ⁶lethmedvet@gmail.com;

⁷nataannsantos23@gmail.com; ⁸raphaelfordonho@gmail.com; ⁹irlandesonsilva@gmail.com;

¹⁰thyagogurjaovp@gmail.com

Resumo: A interação dos organismos com o seu meio reflete o equilíbrio ecossistêmico. Nesse contexto, os peixes são considerados sentinelas dos ecossistemas aquáticos, uma vez que são mais vulneráveis à exposição aos estressores ambientais, atuando como biomarcadores adequados para as análises dos efeitos tóxicos de substâncias que se encontram em concentrações muito baixas no ambiente. Concomitantemente à expansão demográfica de seres humanos, observa-se o agravamento dos impactos ambientais em ecossistemas terrestres e aquáticos. Evidencia-se, portanto, a necessidade de implementação de programas de monitoramento ambiental a fim de incrementar o potencial conservacionista da biodiversidade e dos ecossistemas. O presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes técnicas de coloração de esfregaço sanguíneo, com corante Giemsa, de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) comercializadas em feira livre do município de Campina Grande, para determinação do potencial de genotoxicidade através do teste do micronúcleo písceo. Foram adquiridos quatro espécimes de tilápias-do-nilo para a coleta de amostras de sangue, transportados em recipientes com água do tanque original de armazenamento para o Laboratório de Anatomia Veterinária da Faculdade Rebouças de Campina Grande (FRCG). As amostras foram coletadas por venopunção da veia vertebral caudal, utilizando a abordagem lateral, e armazenadas em microtubos de coleta estéreis com heparina sódica, sendo então encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da instituição para confecção dos esfregaços sanguíneos. As lâminas foram submetidas a três técnicas distintas com quatro repetições, denominadas (T1, T2 e T3), diferindo quanto ao tempo de imersão e à solução de corante Giemsa utilizada. Para avaliação dos esfregaços sanguíneos, foram considerados os aspectos macro e microscópicos, apontando a técnica T3 como a mais efetiva para visualização e diferenciação dos componentes sanguíneos. Para avaliação dos componentes celulares, foi empregada a análise quantitativa de macrolesões no genoma, a qual permitiu a identificação do potencial de genotoxicidade na região, indicada pela presença de células micronucleadas e alterações morfológicas nucleares. Os resultados demonstram a necessidade investigação e aplicação de medidas de controle para mitigação da contaminação dos reservatórios de água doce do município de Campina Grande.

PUC-Campinas EESC USP Comitês PCJ

APRESENTAM:

SUSTENTARE & WIPIS2023

WORKSHOP INTERNACIONAL

SUSTENTABILIDADE, INDICADORES E GESTÃO DE RECURSOS HÍDRICOS



22/11 | evento
23/11 | 100% online
24/11 | e gratuito

Palavras-chave: Análise laboratorial, Biomarcador, Contaminação, Hematologia, Micronúcleo.

1. INTRODUÇÃO

A interação dos organismos com o seu meio reflete o equilíbrio ecossistêmico, permitindo que a sanidade do ecossistema seja mensurada por meio da sanidade dos organismos que ali habitam. Dessa forma, os peixes são considerados sentinelas dos ecossistemas aquáticos, uma vez que são mais vulneráveis à exposição aos estressores ambientais, atuando como biomarcadores adequados para as análises dos efeitos tóxicos de substâncias que se encontram em concentrações muito baixas no ambiente [1]. Concomitantemente à expansão demográfica de seres humanos, observa-se o agravamento dos impactos ambientais em ecossistemas terrestres e aquáticos. Evidencia-se, portanto, a necessidade de implementação de programas de monitoramento ambiental mais eficazes, a partir da avaliação dos sistemas bióticos e/ou abióticos associados às análises físicas, químicas e genômicas, com o objetivo de incrementar o potencial conservacionista da biodiversidade e dos ecossistemas [1]. Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes técnicas de coloração de esfregaço sanguíneo, com corante Giemsa, de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) comercializadas em feira livre do município de Campina Grande, para determinação do potencial de genotoxicidade através do teste do micronúcleo píceo.

2. METODOLOGIA

Foram adquiridos quatro espécimes de tilápias-do-nilo para a coleta de amostras de sangue, transportados em recipientes com água do tanque original de armazenamento para o Laboratório de Anatomia Veterinária da Faculdade Rebouças de Campina Grande (FRCG). As amostras foram coletadas por venopunção da veia vertebral caudal, utilizando a abordagem lateral, e armazenadas em microtubos de coleta estéreis com heparina sódica [2], sendo então encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da instituição para confecção dos esfregaços sanguíneos. As lâminas foram submetidas a três técnicas distintas de coloração com quatro repetições, denominadas (T1, T2 e T3). Foi utilizado o corante Giemsa (azur II e eosinato de azul), empregado em extensões sanguíneas de peixes para a pesquisa de hemoparasitas e quantificação de micronúcleo [4]. Em T1, cada lâmina foi imersa em metanol por 30 segundos, sendo submetida ao escoamento vertical durante 2 minutos e, em seguida, à imersão em corante

PUC-Campinas EESC USP Comitês PCJ

APRESENTAM:

SUSTENTARE & WIPIS2023

WORKSHOP INTERNACIONAL

SUSTENTABILIDADE, INDICADORES E GESTÃO DE RECURSOS HÍDRICOS



22/11 | evento
23/11 | 100% online
24/11 | e gratuito

Giemsa por 3 minutos. Em T2, o tempo de imersão em metanol foi de 2 minutos, sucedida pelo escoamento vertical durante 2 minutos e, em seguida, imersão em corante Giemsa por 10 minutos [3]. Finalmente, em T3, a imersão em metanol ocorreu em um período de 3 minutos, sucedida pelo escoamento vertical durante 2 minutos e, em seguida, imersão em solução homogênea de 9 mL de água destilada e 1 mL de corante Giemsa por 20 minutos, preparada previamente. Ao final desses procedimentos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secadas em temperatura ambiente na posição vertical e encaminhadas para avaliação em microscopia óptica. As lâminas foram avaliadas com base em seu aspecto macroscópico e microscópico pós-coloração. Para avaliação dos componentes celulares, foi empregada a análise quantitativa de macrolesões no genoma, que se baseia na contabilização do número de células micronucleadas, onde a quantidade de células apresentando micronúcleos em relação às células normais pode estimar o nível do impacto decorrente do agente perturbador.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do preparo das lâminas e avaliação em microscopia óptica, observou-se que a técnica T3 foi mais efetiva, permitindo a visualização e diferenciação dos componentes celulares sanguíneos. Macroscopicamente, os esfregaços sanguíneos confeccionados com essa técnica apresentaram-se na cor roxo mate uniforme; enquanto que, no aspecto microscópico, os eritrócitos apresentaram-se azulados, com delimitação clara entre citoplasma e núcleo (Figura 1), indicando o aspecto desejado para uma boa coloração. Infere-se, portanto, a influência da solução utilizada e do tempo de imersão na qualidade final da coloração do esfregaço sanguíneo. A avaliação dos componentes celulares demonstrou a presença de células micronucleadas e com alterações morfológicas nucleares. O eritrócito maduro normal de um peixe apresenta forma oval a elipsoide, com citoplasma eosinofílico pálido e abundante, núcleo oval a elipsoide posicionado de forma central e cromatina nuclear densamente agregada, corando-se em roxo-escuro [2]. Por sua vez, o micronúcleo é uma estrutura de fácil diferenciação do eritrócito normal, apresentando-se no citoplasma como uma pequena porção de cromatina, de formato arredondado, resultante de algum dano ou instabilidade genômica decorrente de fatores químicos, físicos ou biológicos. A presença de células micronucleadas caracteriza-se como um dos marcadores genéticos mais eficientes para avaliação do potencial de genotoxicidade [1].

PUC-Campinas EESC USP Comitês PCJ

APRESENTAM:

SUSTENTARE & WIPIS2023

WORKSHOP INTERNACIONAL

SUSTENTABILIDADE, INDICADORES E GESTÃO DE RECURSOS HÍDRICOS



22/11 | evento
23/11 | 100% online
24/11 | e gratuito

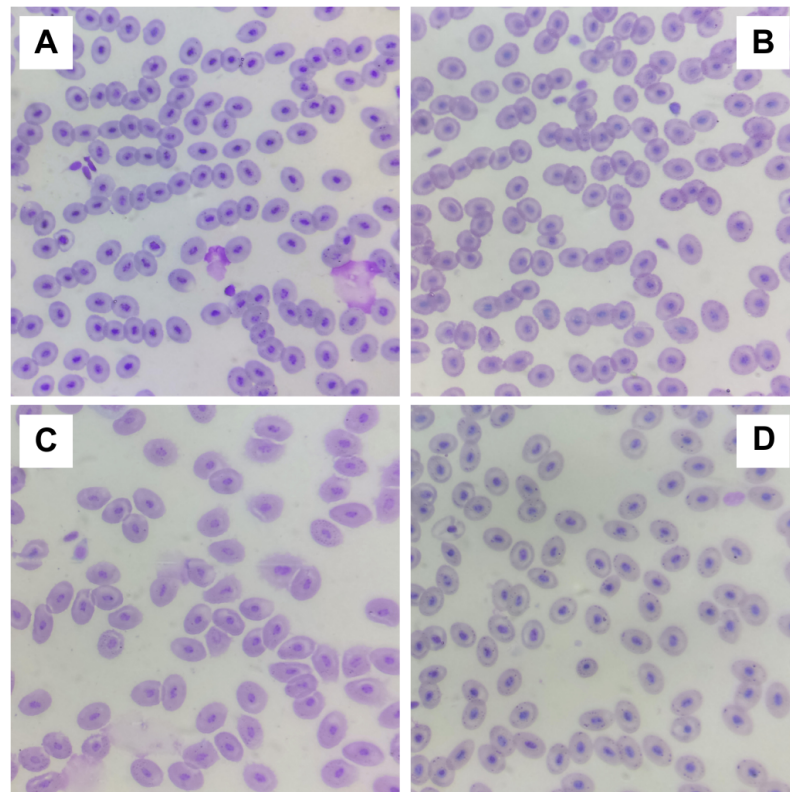


Figura 1. Fotomicrografia de eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Aumento de 40x.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nessa perspectiva, o achado de células micronucleadas nos eritrócitos dos animais avaliados demonstraram um nível de impacto genotóxico no município de Campina Grande- PB, evidenciando a necessidade de tomada de ações para investigar e mitigar a contaminação dos reservatórios de água doce nessa localidade.

PUC-Campinas EESC USP Comitês PCJ

APRESENTAM:

SUSTENTARE & WIPIS2023

WORKSHOP INTERNACIONAL

SUSTENTABILIDADE, INDICADORES E GESTÃO DE RECURSOS HÍDRICOS



22/11 | evento
23/11 | 100% online
24/11 | e gratuito

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Faculdade Rebouças de Campina Grande por dispor da infraestrutura e dos insumos necessários para a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- [1] ADAM, Mônica L. Espécies sentinelas: Monitoramento Ambiental com base em biomarcadores de efeito cito- e genotóxico. **Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha**, [s. l.], v. 12, p. 1-28, 2023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/369991943_Especies_Sentinelas_Monitoramento_Ambiental_com_Base_em_Biomarcadores_de_Efeito_Cito-e_Genotoxico. Acesso em: 20 out. 2023.
- [2] CAMPBELL, Terry W. Hematologia dos peixes. In: THRALL, Mary Anna *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. cap. 21, p. 638-670. ISBN 978-85-277-2659-7.
- [3] Giemsa. [Bula]. Minas Gerais: Renylab Quim. Farm. LTDA. Disponível em: <https://www.renylab.ind.br/wp-content/uploads/2018/05/Giemsa.pdf>. Acesso em: 20 out. 2023.
- [4] PAIVA, Maria José Tavares Ranzani de *et al.* **Métodos para análise hematológica em peixes** [online]. Maringá: EDUEM, 2013, 140 p. ISBN 978-85-7628-653-0.