



ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCITÁRIAS COMO BIOMARCADOR DA QUALIDADE DA ÁGUA DO ARROIO PADRE DOUTOR

ZAFALON-SILVA, Bruna¹ ²; BOBROWSKI, Vera Lucia¹

¹ Universidade Federal de Pelotas, IB, Depto. de Zoologia e Genética, C.P.354, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: brunazs@hotmail.com

² Bolsista de iniciação Científica do CNPq (PIBIC)

A demanda por água doce em todo o mundo tem aumentado de maneira exponencial. Paralelamente, a degradação de sua qualidade tem reduzido ainda mais sua disponibilidade (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005). Atualmente, em várias regiões é possível observar que os ecossistemas vêm sofrendo alterações que podem estar associadas à atividade humana principalmente em decorrência do desenvolvimento industrial, urbano e agrícola. No que se refere aos ecossistemas aquáticos, as atividades antrópicas geram impactos econômicos, sociais e ecológicos, promovendo lentas e muitas vezes irreversíveis modificações nesses ambientes (BOHRER, 1995).

Desta forma, a poluição aquática pode ser definida como a introdução direta ou indireta de substâncias ou energia no ecossistema de modo a resultar em efeitos deletérios aos recursos vivos, redução da qualidade da água e de atividades a ela relacionadas, tais como pesca, recreação, abastecimento de cidades e outros. Um outro problema relacionado com a poluição é a modificação da estrutura genética dos organismos aquáticos, através da incorporação de produtos citotóxicos e/ou genotóxicos, cujos efeitos prejudiciais aos seres humanos ainda são desconhecidos, por efeito acumulativo e que podem vir a acarretar inclusive modificações no DNA. (MANSON, 1996).

Quando diversos poluentes estão presentes, na forma de misturas complexas, mudanças bioquímicas específicas podem indicar qual o tipo de poluente responsável pelo efeito predominante (WALTER, 1996). Desta forma, as propriedades bioquímicas e celulares alteradas na presença de um poluente no ambiente são utilizadas como biomarcadores, indicando que o composto tóxico está biodisponível no ambiente em quantidade e tempo suficientes para gerar resposta biológica (NEWMAN, 1998).

Os micronúcleos são caracterizados como biomarcadores de efeito, sendo teste de micronúcleo um ensaio tecnicamente simples que permite a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos. Ele tem sido amplamente utilizado há vários anos, sendo, portanto, bem validado e com um grande número de substâncias testadas. É uma técnica de triagem rápida e de baixo custo, adequada para avaliar a exposição de peixes marinhos e de água doce a contaminantes. (MATSUMOTO e CÔLUS, 2000).

O Arroio Padre Doutor, localizado próximo ao município do Capão do Leão (31°45'S/52°29'W), atravessa zonas industriais, urbanas e rurais, por consequência acometendo o impacto antrópico e a utilização incoerente dos seus recursos hídricos. Ainda, além do uso industrial, irrigação e diluição de despejos domésticos e industriais, o arroio, além de receber muitos tipos de descargas, tanto de efluentes industriais e cloacais como de resíduos urbanos, no entanto, suas águas destinam-se ao abastecimento e recreação. (CUCHIARA, 2007).

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da qualidade das condições da água do Arroio Padre Doutor através do teste de micronúcleos em sangue periférico de *Astyanax* spp. (Teleostei: Characidae), avaliando a variação do número de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) entre coletas, as quais foram realizadas sazonalmente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Exemplares de *Astyanax* spp. foram capturados, com anzol e linha, em três pontos pré-determinados com base em critérios ambientais e sanitários de forma a se abordar áreas de influência antrópica no Arroio Padre Doutor (P1= 31°44'50.20" S; 52°29'13.48" O; P2= 31°45'25.99" S; 52°29'19.25" O; P3= 31°48'30.18" S; 52°25'14.41" O), nos dias, 1º fevereiro de 2007 (n=6), 3 de maio 2007 (n=10), 13 de novembro de 2007 (n=10) e 4 de fevereiro de 2008 (n=14) entre o horário de 8 e 12 horas da manhã com esforço de captura de 30 minutos por ponto com um anzol.

Imediatamente após a captura, retiradas amostras de sangue de cada animal, através de punção da artéria caudal, mediante o uso de seringas hipodérmicas e agulhas heparinizadas (GRASSI, 2002; MARTINEZ & CÓLUS, 2002). Foram confeccionadas duas extensões sangüíneas por indivíduo, posteriormente submetidas à secagem por 24h em temperatura ambiente, fixadas em metanol e coradas com Giemsa 5%, durante 20 minutos (GRISOLIA & STARLING, 2001).

Foram observados 5000 eritrócitos por indivíduo, sendo 2500 eritrócitos por lâmina confeccionada, utilizando microscópio óptico de em magnificação 1000X. Os critérios utilizados para a avaliação de micronúcleos em eritrócitos de peixes, estão de acordo com Ferrari (1991), Titenko-Holland et al. (1997) e Fenech et al. (2003).

O teste estatístico utilizado foi o de Kruskal-Wallis pelo programa para computadores "Statistic" Versão 6.0.0.251.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos esfregaços sanguíneos de animais oriundos das diferentes coletas foram observadas anomalias como: micronúcleo (MN), núcleo com cavidade (N/C), brotamento (BRT), núcleo bilobulado (Bilob) e célula binucleada (BN).

Como não houve diferença estatística entre os pontos de coleta ($p > 0,05$) em termos de aberrações observadas, os dados dos diferentes locais foram agrupados e estão representados na Tabela 1, seguidos de suas frequências e conforme o mês de coleta.

Tabela 1. Frequência média de anormalidades eritrocitárias observadas em peixes do Arroio Padre Doutor. Micronúcleo (MN); núcleo com cavidade (N/C); brotamento (BRT); núcleo bilobulado (Bilob); célula binucleada (BN); não observado (NO).

	MN	BRT	N/C	Bilob	BN
Fev/07	0,084±0,280	1,416±1,670	0,084±0,280	0,840±0,280	NO
mai/07	0,158±0,370	2,630±1,460	1,300±0,370	0,684±0,200	0,158±0,380
Nov/07	0,70±0,33	8,60±1,88	1,60±0,83	2,60±0,97	0,70±0,33
Fev/08	0,21±0,11	7,21±0,69	2,21±0,70	3,79±0,91	0,77±0,33

Não foram detectadas variações estatísticas ($p>0,05$) no número de ANEs do tipo MN, N/C, Bilob ($P= 0,651$), e BN) entre as coletas. O brotamento foi a anomalia mais freqüente porém sem diferença significativa ($P=0,07$).

Segundo Afanasieva et al. (2006) as alterações morfológicas nucleares podem ser devidas a células que se duplicaram, mas não completaram a citocinese; amplificação gênica que será eliminada através de brotamentos ou divisão amitótica incompleta. Ainda não são conhecidas as causas que levam a formação de núcleos com cavidade.

A presença de eritrócitos bilobulados (em divisão amitótica) no sangue periférico pode estar associada com aumento provisório da capacidade de transporte de oxigênio, ou ainda com uma forma de senescência celular (HOUSTON & MURAD,1995).

Os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros, que acabam sendo perdidos durante a mitose. Geralmente são formados devido à exposição à substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas. Por outro lado, de acordo com Zuniga-Gonzales, (2001) a taxa destas alterações pode depender da espécie, do genótipo, mecanismos de reparo do DNA, segregação cromossomal deficiente, estado imune, sexo e idade do indivíduo.

Segundo Ramsdorf (2007), os espécimes do gênero *Astyanax* são bons biomonitores de qualidade ambiental. Entretanto, durante um ano de coleta, não foi constatado variações na taxa de ANEs.

CONCLUSÃO

Com base nos dados de que não houve mudanças significativas nas anormalidades nucleares eritrocitárias, não foi possível observar variação das condições de qualidade da água através do teste de MN, durante o período entre coletas, o que pode estar relacionado com o desenho experimental utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOLI, C.V.; CARNEIRO, C (Eds.) **Gestão Integrada de Mananciais de abastecimento Eutrofizados**. Curitiba: SANEPAR, Finep, 2005.

AFANASIEVA, T.A.; WITTNER, M.; VITALITI, A.; AJMO, M.; NERI, D.; KLEMENZ, R. **Gene Ther**, 10, 1850.

BOHRER, M.B.C. **Biomonitoramento das Lagoas de Tratamento Terciário dos Efluentes Líquidos Industriais (SITEL) do Pólo Petroquímico do Sul, Triunfo, RS, Através da Comunidade Zooplânctônica**.1995. 470p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais)- Departamento de Ciências, Universidade Federal de São Carlos.

CÓLUS, I. M. S., MARTINEZ, C. B. R.; **Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi**. In: MEDRI, M. E. *et al.* Editores. Londrina, PR : M. E. Medri, 2002, p. 551-577.

CUCHIARA, Cristina C. **Biomonitoramento de Cursos D'Água de Importância Econômica e Social para a Região Sul do Rio Grande do Sul**. 2007. f. Monografia de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FENECH, M. *et al.* **Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes**. *Mutation Res.*, 534, p. 45 – 64, 2003.

FERRARI, I. **Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos**. In: Sociedade Brasileira de Genética, **Revista Brasileira de Genética**, p. 107-112, 1991.

GRASSI, L.E.A.. **Hematologia, biometria, teor de compostos organoclorados e frequência de formação de micronúcleos em teleósteos de água doce, sob diferentes condições limnológicas**. 2002. 166p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

GRISOLIA, C. K. AND STARLING, F, L. R. M. **Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges**. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 491, p. 39-44, 2001.

HOUSTAN, A.H. & MURAD, A. **Erythrokinetics in fish**. *can. J. Zool.*, 73:411-418, 1995.

LANDOLT, M.L. & KOCAN, R.M. **Fish cell cytogenetics: a measurement of the genotoxic effects of environmental pollutants**. *Aquatic Toxicol.*, p.335-353, 1983.

MATSUMOTO, E. *et al.* Editores. Londrina, PR : M. E. Medri, 2000, p. 551-577.

MANSON, C. F. **Biology of freshwater pollution**. 3rd ed. Longman, Essex. 1996.

NEWMAN, MC. 1998. **Fundamentals of ecotoxicology**. Ann Arbor Press. Chelsea, USA. 402p.

RAMSDORF, W. A. **UTILIZAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) COMO BIOINDICADORES DE REGIÃO CONTAMINADA POR AGROTÓXICO (FAZENDA CANGÜIRI – UFPR)** Dissertação de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M.T. **Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers**. *Mutation Res.*, 338: p. 85-95, 1997.

WALKER, CH. 1996. **The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals**. *Ecotox. Environ. Safe.*, 40: 60-70.

ZUNIGA-GONZALES G., TORRES-BUGARIN O., ZAMORA- PEREZ A. et al. 2001. **Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species.** – Mutation Research, 494: 161 – 167.