

Avaliação da Geração de Micronúcleo em Junvenis de *Centropomus parallelus* (Robalo-Peva) Expostos a Diferentes Concentrações Salinas¹

Larissa Martins

Estudante, Técnico em Meio Ambiente, IF-SC,

larimartins85@yahoo.com.br;

Aurora Vargas Paz

Estudante, Técnico em Meio Ambiente, IF-SC,

auroravargaspaz@hotmail.com

Débora Monteiro Brentano

Professora do Curso Técnico em Meio Ambiente, IF-SC,

brentano@ifsc.edu.br.

Resumo: O Teste do Micronúcleo (MN) em peixes tem sido utilizado como um modelo experimental para detecção de compostos genotóxicos e avaliação dos seus efeitos na biota de ambientes aquáticos contaminados por esses poluentes. Estudos têm mostrado diferentes efeitos da variação da salinidade da água em peixes, no que tange parâmetros sanguíneos e sobrevivência. Este trabalho avaliou o efeito da variação desta condicionante sobre a espécie eurialina *Centropomus parallelus* (robalo-peva), em nível citogenético, através do teste do micronúcleo, para futuras avaliações da genotoxicidade de amostras de água doce. Os peixes, que estavam inicialmente adaptados a viveiro contendo águas com 30 ‰ de salinidade, foram submetidos a dois tipos de tratamento: passagem para água doce de forma abrupta e gradual. Os animais já adaptados a água com 30 ‰ de salinidade foram usados para controle negativo. Após os tratamentos, retirou-se o sangue da veia caudal dos peixes; preparou-se o esfregaço em lâminas; fixaram-se as células e estas foram coradas através do método Feulgen-Fast-Green. Analisaram-se 4.000 eritrócitos de cada animal (n=5, para cada tratamento), utilizando microscópio de luz. Para comparação dos três grupos realizou-se o teste paramétrico Anova, com nível de significância 0,05. Como resultado, não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Portanto, qualquer uma das formas de passagem do robalo-peva de águas com salinidade 30 ‰ para água doce, não irá influenciar futuros testes de micronúcleos que necessitem expor esses animais a amostras com salinidades inferiores àquela onde o animal encontra-se.

Palavras-chave: Teste do Micronúcleo; Variação de Salinidade; *Centropomus parallelus*.

1 Introdução

O Teste do Micronúcleo (MN) é um ensaio capaz de detectar a ação de agentes genotóxicos clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem a aneuploidia ou a segregação cromossômica anormal), através da identificação de micronúcleos gerados por esses danos. Os micronúcleos são vistos nas células filhas em decorrência de danos que ocorreram nas células parentais (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Eles são formados

a partir da condensação dos cromossomos acêntricos (fragmentos de cromossomos) e/ou cromossomos inteiros que não migraram para os pólos dos fusos mitóticos na mitose celular. A formação do micronúcleo completa-se na telófase com o envolvimento do material genético por uma membrana nuclear (Figura 01) (FENECH; MORLEY, 1985a, 1985b).

O teste do micronúcleo em peixes tem sido utilizado como um modelo experimental para a avaliação da contaminação e dos efeitos genotóxicos de poluentes em ecossistemas aquáticos (AI-SABTI; METCALFE, 1995).

¹ RTC, Florianópolis, SC, v.02, nº 01,p.13-16, 2010

Alguns estudos têm demonstrado a sensibilidade de diferentes espécies de peixes a compostos genotóxicos e a ambientes considerados poluídos, através da frequência de micronúcleo (GALINDO; MOREIRA, 2009; MINISSI; CICCOTTI; RIZZONE, 1996). Os peixes são considerados elementos viáveis para o monitoramento da qualidade dos ambientes aquáticos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) pois, dentre outras coisas, ocupam uma posição importante na cadeia trófica, como um transportador de energia de níveis tróficos menores para níveis maiores (BEYER, 1996 apud OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

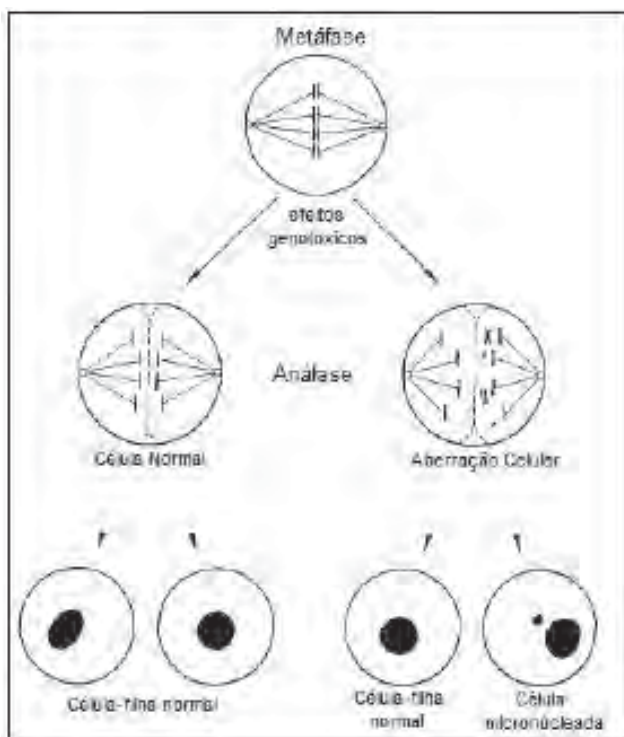


Figura 01 - Mecanismo de formação do micronúcleo durante a mitose celular. Fonte: Adaptado de Al-Sabti e Metcalfe (1995).

Diversos estudos têm demonstrado diferentes respostas de espécies de peixes à variação de salinidade, ao avaliar parâmetros hematológicos (CAMARGO; POUHEY; VAZ, 2006; KARŞI; YAVUZCAN YILDIZ, 2005) e de sobrevivência (FONSECA NETO; SPACH, 1998/1999; MACIEL, 2005; TSUZUKI et al., 2007). Com base nisso, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da variabilidade da salinidade (variação abrupta ou gradual) em nível citogenético, por meio do teste do micronúcleo, na espécie eurialina *Centropomus parallelus*. Além disso, este estudo gera subsídios científicos para futuras pesquisas, ao verificar se a exposição dos organismos da espécie *Centropomus parallelus* a amostras com salinidades distintas daquela em que o organismo encontra-se originalmente (água salgada/salobra)

poderia gerar micronúcleos, interferindo na avaliação da genotoxicidade destas mesmas amostras.

2 Materiais e Métodos

2.1 Organismo-teste

O organismo-teste escolhido foi a espécie *Centropomus parallelus* (robalo-peva), cujos indivíduos juvenis foram disponibilizados pelo Laboratório de Piscicultura Marinha da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A escolha desta espécie foi baseada principalmente em sua ampla tolerância à variação de salinidade.

Centropomus parallelus, da família Centropomidae, é uma espécie eurialina que geralmente habita águas costeiras, estuários, lagoas costeiras e costuma penetrar em águas doces continentais. É um organismo adaptado a climas subtropicais e nativo da Flórida do Sul (EUA) e da região entre a costa do Golfo do México e Florianópolis, Brasil (FISH BASE, s.d).

2.2 Procedimento Experimental

Os juvenis da espécie *Centropomus parallelus*, com 1 ano de idade e peso e comprimento aproximado de 13g e 14cm, respectivamente, foram submetidos a dois tratamentos: tratamento 1 - passagem abrupta e tratamento 2 - passagem gradual.

Quinze peixes, que estavam adaptados e vivendo em viveiro com água de salinidade 30‰, temperatura aproximada de 27°C e com 4,35 mg. L⁻¹ de oxigênio dissolvido, foram transferidos deste local para tanques com 150 L de água de mesma salinidade. A partir deste tanque, cinco exemplares foram repassados para água doce (salinidade 0‰), 24 horas antes da coleta do sangue para realização do teste do MN (tratamento 1 – passagem abrupta). Um segundo grupo de cinco peixes foi aclimatado durante o período de três dias, ao transferi-los do tanque inicial com salinidade 30‰ para a salinidade 15‰, e posteriormente para tanques com água doce, com um intervalo de tempo de 24 horas cada (tratamento 2 – passagem gradual). Um terceiro grupo de cinco peixes foi mantido à salinidade 30‰ no tanque inicial, até a realização da punção sanguínea (controle negativo).

2.3 Teste do Micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo, inicialmente coletou-se o sangue da veia caudal do organismo-teste, utilizando seringa de 3 mL com anticoagulante EDTA (ácido

etilenodiamino tetra-acético) da marca “Nuclear” (10%). Em seguida, prepararam-se esfregaços do sangue recém coletado, para posterior fixação das células em lâmina por 20 minutos utilizando metanol absoluto; e coloração através do método Feulgen-Fast-Green (20 minutos em HCl 5M, 60 minutos no reativo de Schiff e rápida imersão na solução fast-green a 1%).

Foram realizadas contagens de 4.000 eritrócitos por organismo-teste, através da leitura das lâminas em microscópio de luz, utilizando aumento de 1.000 vezes. Os principais critérios utilizados para identificação de micronúcleos foram: (1) a ausência de ligações com o núcleo principal; (2) mesma intensidade da coloração do núcleo principal (FENECH, 2000); (3) o tamanho com uma proporção de 1/10 até 1/30 do tamanho do núcleo principal; (4) mesmo plano focal. Ainda, durante a contagem foram descartadas células sobrepostas e danificadas (AI-SABTI; METCALFE, 1995).

2.4 Análise dos dados

Para verificação da influência da variação de salinidade no número de micronúcleos em eritrócitos da espécie *Centropomus parallelus* (robalo-peba), comparou-se os três grupos (transferência abrupta, gradual e controle negativo) através do teste paramétrico Anova (um critério). Para tal, utilizou-se um nível de significância de 0,05 ($\alpha = 0,05$) e o programa estatístico GraphPad InStat DATASET1. ISD.

3 Resultados e discussão

Neste estudo, avaliando a resposta citogenética de juvenis de *Centropomus parallelus* à variação de salinidade, verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os três grupos de peixes (controle negativo, transferência abrupta e transferência gradual), quanto à quantidade de micronúcleos (Figura 02) contados em 4.000 eritrócitos por indivíduo. Desta maneira, qualquer uma das formas de passagem dos peixes da espécie *Centropomus parallelus* de águas com salinidade 30 ‰ para água doce (0 ‰), não irá influenciar em testes de micronúcleos que utilizem amostras com salinidades inferiores àquela onde o animal encontra-se.

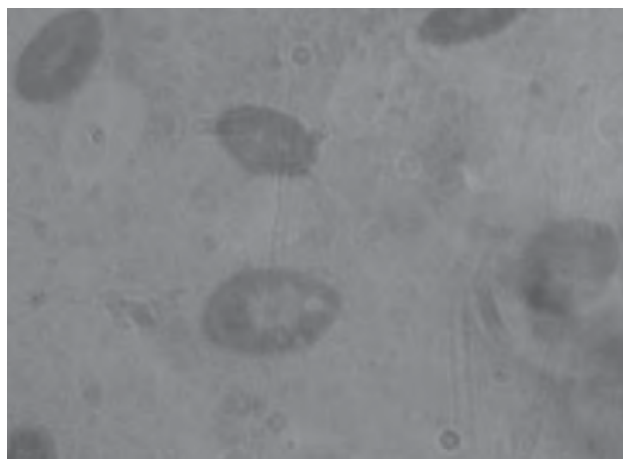


Figura 02 - Foto de microscopia de eritrócito de peixe da espécie *Centropomus parallelus* mostrando uma célula com micronúcleo.

A partir deste resultado nota-se que, em nível citogenético, os juvenis (aproximadamente 1 ano de idade) da espécie *Centropomus parallelus* possuem tolerância a estresses como a variação da salinidade (0 à 30 ‰), seja ela gradual ou abrupta. Acredita-se que isso pode estar atribuído ao fato do robalo-peva ser uma espécie eurialina, e por isso adaptada e resistente à variação de salinidade. Os robalos normalmente habitam diferentes ambientes estuarinos, estando, desta forma, sujeitos a mudanças de salinidade de 0 à 30 ‰ (ALIUME et al., 1997 apud MACIEL, 2005). Segundo Maciel (2005), juvenis de robalo-peva demonstraram grande sobrevivência nas salinidades 5, 15 e 35 ‰, o que comprova a eurialidade desta espécie. Corroborando com o presente estudo, Tsuzuki et al. (2007), ao analisarem a sobrevivência de juvenis (peixes com 52, 59 e 73 dias após a eclosão) de *Centropomus parallelus* na transferência abrupta de águas com 35 ‰ para 0, 5, 15 e 35 ‰, verificaram que esta espécie possui grande tolerância a variações bruscas de salinidade e que esta resistência aumenta com o aumento da idade. Segundo o estudo, os indivíduos com idade de 52 dias após a eclosão foram os que menos resistiram à passagem direta para águas com salinidade 0 ‰.

No entanto, apesar do fato de ser uma espécie eurialina, *Centropomus parallelus* aparentemente mostra-se mais resistente à variação de salinidade do que outras espécies eurialinas. Neste estudo, durante as 24 horas após a transferência dos juvenis robalo-peva da salinidade 30 ‰ para a salinidade nula, não foi observado a morte de nenhum dos cinco exemplares, ao contrário da pesquisa realizada por Fonseca Neto e Spach (1998/1999). Nesta pesquisa, juvenis da espécie eurialina *Mugil platanus* não resistiram à passagem direta da água salgada para a água doce. Segundo os autores, em um dos experimentos, a morte dos

indivíduos iniciou durante a primeira hora de exposição dos mesmos à água doce, observando-se um grande declínio da sobrevivência nas primeiras 12 horas de exposição e morte total dos animais até 96 horas após mudança da salinidade.

4 Conclusões

Este estudo concluiu, por meio do teste do micronúcleo, que a variação da salinidade da água, seja ela gradual ou abrupta, não causa danos citogenéticos à espécie *Centropomus parallelus*. Assim, qualquer uma das formas de passagem do robalo-peva de águas com salinidade 30 ‰ para água doce, não irá influenciar em testes de micronúcleos que necessitem expor esses animais a amostras com salinidades inferiores àquela onde o animal encontra-se.

5 Agradecimentos

Agradecemos à colaboração da Oceanógrafa MSc. Cristiana Vaz Avelar de Carvalho pela assessoria prestada durante a experimentação e ao Prof. Dr. Vinícius R. Cerqueira, ambos do Laboratório de Piscicultura Marinha, pela doação dos juvenis *Centropomus parallelus*.

6 Referências bibliográficas

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v.343, p. 121-135, 1995.

CAMARGO, S. G. O. de; POUHEY, J. L. O. F.; VAZ, B. dos S. Efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos do jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824). *R. Bras. Agrociência*, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 453-460, out/dez 2006.

FISH BASE. *Centropomus parallelus* Poey, 1860. Disponível em: < <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=1014>>. Acesso em: 14 abril 2010.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 445, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY A. A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, n. 43, p. 233-246, 1985a.

FENECH, M.; MORLEY A. A. Measurement of

micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* n. 147, p. 29–36. 1985b.

FONSECA NETO, J. C. da; SPACH, H. L. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Boletim do Instituto de pesca*, São Paulo, v.25 (único), p. 13 – 17, 1998/1999.

GALINDO, T. P.; MOREIRA, L. M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 2, p. 394-398, 2009.

InStat DATASET 1.ISD. Version 3 for Windows. GraphPad Software, s.d. 1 CD-ROM.

KARŞI, A; YAVUZCAN YILDIZ, H. Secondary stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, after direct transfer to different salinities. *Tarim Bilimleri Dergisi*, v. 11, n. 2, p. 139-141, 2005.

MACIEL, J. C. Efeito da salinidade na sobrevivência e no crescimento de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus*. 2005. 34 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2005.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research*, v. 367, p. 245-251, 1996.

OOST, R. van der; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagenese ambiental. Canoas: Editora da Ulbra, 2003.

TSUZUKI, M. Y.; CERQUEIRA, V. R.; TELES, A.; DONEDA, S. Salinity tolerance of laboratory reared juveniles of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 55, n. 1, p. 1-5, 2007.