

## CONTAGEM DE MICRONÚCLEO ERITROCIÁRIO COMO INDICADOR DE GENOTOXICIDADE APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA AO COBRE NO PEIXE *Poecilia vivipara*

MAIDANA DA SILVA IDIARTE<sup>1</sup>; TAINÁ GUILLANTE<sup>2</sup>; RICARDO BERTEAUX  
ROBALDO<sup>2</sup>;  
YURI DORNELLES ZEBRAL<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – maydanaidiarte@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – tainaguillante@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – ricardorobaldoufpel@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio grande – yurizebral@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Organismos aquáticos estão constantemente em contato com poluentes e contaminantes em decorrência dos impactos causados por ações antrópicas. Um destes poluentes é o Cobre (Cu), que em pequenas concentrações atua como um micronutriente essencial operando, por exemplo, no funcionamento de proteínas como a Hemocianina (WHITE E RAINBOW, 1982) e na sinalização hormonal (DANG *et al*, 2000). Porém ZEBRAL *et al* (2018), demonstram que quando encontrado em concentrações elevadas nos tecidos do peixe *Poecilia vivipara*, o Cu torna-se tóxico e causa danos que incluem inibição da ação de hormônios e da síntese proteica, levando a consequências como redução no tamanho corporal destes animais.

*Poecilia vivipara* (BLOCH & SCHNEIDER, 1801), (Teleostei: Poeciliidae), é um modelo utilizado para estudos ecotoxicológicos, considerando sua vasta distribuição pela costa brasileira, fácil manutenção e reprodução em cativeiro, além da sua ampla tolerância a variações ambientais, como salinidade.

Sabe-se que no ano de 2000, em regiões próximas a atividades portuárias ao sul da Lagoa dos Patos, foram registradas concentrações médias de Cu de 21,6µg/L (BARBOSA, 2012), considerada acima dos níveis permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Concentrações como esta causam preocupação quanto ao equilíbrio e sobrevivência das espécies aquáticas.

O cobre pode causar danos teciduais e celulares. Çavas *et al* (2005), demonstraram que indivíduos de *Carassius gibelio* e *Cyprinus carpio* expostos a 0,25mg/L de Cu por 21 dias, apresentaram formação de micronúcleo em células eritrocíticas e dos tecidos branquiais e hepáticos, além de lesões visíveis no fígado, como mudança na coloração e necrose. Micronúcleos são alterações celulares (Figura 1), caracterizadas por fragmentos do núcleo que se separam do núcleo principal durante a anáfase na divisão celular, originando massas de cromatina no citoplasma (ÇAVAS *et al*, 2005).

Sendo assim, a contagem de micronúcleo é uma técnica amplamente utilizada como um indicador de genotoxicidade, embora não seja muito eficaz para exposições à longo prazo (>14 dias) por apresentar redução na formação das alterações celulares ao longo do tempo (ÇAVAS *et al*, 2005).

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo verificar a genotoxicidade do metal Cobre através da técnica de contagem de micronúcleos, utilizando indivíduos do peixe *Poecilia vivipara*, expostos às concentrações de 9µg/L e 20µg/L durante 96h.

## 2. METODOLOGIA

Após a aclimação em laboratório por 21 dias em água a salinidade de 10ppm e temperatura de 24°C, o ensaio consistiu em expor indivíduos de *Poecilia vivipara* a duas concentrações de Cobre (9µg/L e 20µg/L) mais o grupo controle, na temperatura de 24°C pelo período total de 96h. O desenho experimental deu-se em triplicatas. Inicialmente machos e fêmeas foram selecionados aleatoriamente e distribuídos pelas unidades experimentais (5 casais por caixa) previamente contaminadas com CuCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cobre anidro utilizando uma micropipeta. Cada unidade formou-se por uma caixa plástica preenchida com 38L de água a salinidade 10ppm, um aquecedor com termostato e aeração constante.

Durante o período de exposição, os animais não foram alimentados e houve troca de água de aproximadamente 90% do volume total diariamente a fim de manter os níveis do contaminante constantes. A cada 24h foram coletadas amostras d'água para posterior verificação da quantidade de cobre total e dissolvido presentes nas unidades experimentais bem como para determinar os níveis de qualidade da água em termos de pH e compostos nitrogenados, utilizando testes comerciais (LabconTest).

Após 96h de exposição, cada peixe foi individualmente anestesiado (Benzocaína) para determinação do sexo, seguido por pesagem (g) e medida do comprimento total (cm). Feito isso, ocorreu a coleta de sangue por secção do pedúnculo caudal, para confecção de extensões sanguíneas (3/peixe).

As lâminas sanguíneas foram fixadas por imersão em Metanol (5 minutos) e posteriormente coradas com Panótico (Instant-Prov). A contagem de micronúcleo deu-se pela análise de 1000 eritrócitos (Çavas *et al*, 2005) por lâmina, utilizando 4 lâminas por tratamento. Ainda de acordo com Çavas *et al* (2005), os critérios para determinação de micronúcleo foram: (a) Micronúcleo claramente separado do núcleo principal; (b) Núcleo principal e micronúcleo apresentarem a mesma coloração e mesmo plano focal.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, evidenciamos que não houveram diferenças significativas (Figura 2) entre os três tratamentos na contagem de micronúcleos eritrocitários. As médias  $\pm$  desvio padrão para a presença de micronúcleos foram  $3,5 \pm 1,84$ ;  $3 \pm 1,47$  e  $4,25 \pm 2,28$ , para os grupos controle, 9µg/L e 20µg/L, respectivamente.

O teste da análise do micronúcleo indica genotoxicidade a partir de perdas e danos cromossômicos (WINTER *et al*, 2007) ou mudanças em proteínas como tubulinas, envolvidas com a segregação cromossômica durante a mitose (ZAFALON-SILVA *et al*, 2017).

Uma explicação para os resultados encontrados está relacionada a atividade mitótica e a meia-vida dos tipos celulares. Eritrócitos, tem ciclos celulares mais longos comparados aos de células branquiais, por exemplo, que por sua vez tem taxas de renovação elevadas, como é pontuado por Arkhipchuk e Garanko (2005). Dessa forma, a resposta à estressores ambientais em células sanguíneas dá-se de maneira mais lenta. Também, Winter *et al* (2007) demonstraram que indivíduos de *Pimephales promelas* tratados com injeção de Mitomicina C, apresentam formação

de micronúcleos em eritrócitos do baço, mas não no sangue periférico. O autor sugere que o ciclo celular desempenhe um papel importante nos resultados.

Sendo assim, o tempo de exposição ao contaminante e o tecido a ser analisado pode ter influência sobre os resultados. Arkhipchuk e Garanko (2005) não constatarem valores significativos de micronúcleos eritrocitários após submeterem indivíduos de *Carassius auratus gibelio* às concentrações de 0,1mg/L e 2,5mg/L de Cu pelo período de 2-5 dias. Embora Çavas *et al* (2005) tenha evidenciado presença significativa de micronúcleo em eritrócitos de indivíduos de *Carassius gibelio* e *Cyprinus carpio* expostos a 0,25mg/L de Cu durante 21 dias.



Figura 1: Micronúcleo em eritrócito do peixe *Poecilia vivipara*. Lâmina corada com Panótico (Instant-Prov).

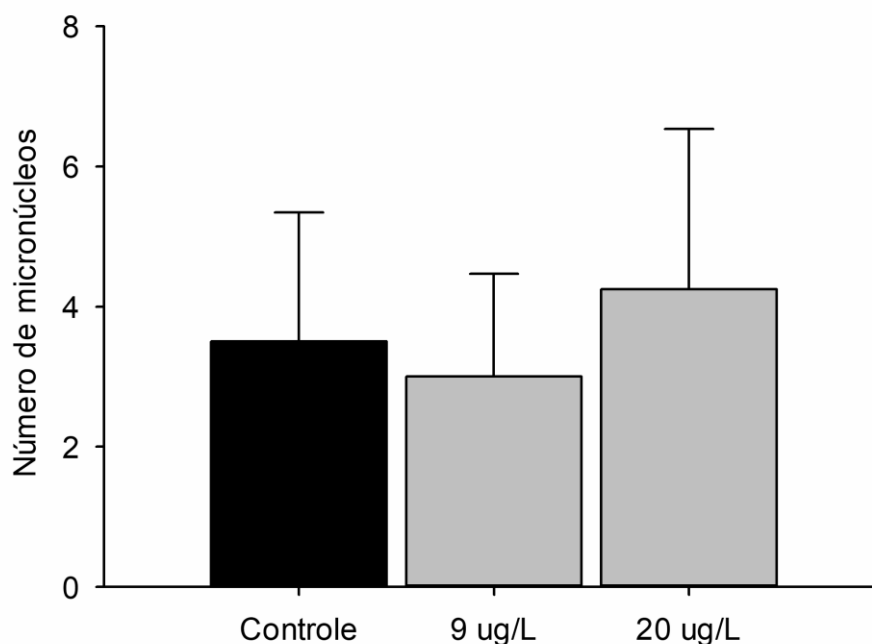


Figura 2: Número de micronúcleos encontrados em eritrócitos do peixe *Poecilia vivipara* após exposição por 96h às concentrações de 9µg/L e 20µg/L de cobre.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a exposição aguda às concentrações de cobre testadas, não alteraram a frequência de micronúcleos eritrocitários em *P. vivipara*. Entretanto, os resultados apresentados neste trabalho são preliminares. Faz-se necessário uma nova análise utilizando um número amostral maior.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. (2005). Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 62(1), 42–52. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.01.001
- BARBOSA, F. G.; WALLNER-KERSANACH, M.; ZEPKA, M. G. Metais traço nas águas portuárias do estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 27-36, 2012.
- ÇAVAS, T; GARANKO, N.N; ARKHIPCHUK V.V. (2004). Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulfate. **Elsevier** (2004). doi:10.1016/j.fct.2004.12.014
- DANG, Z.C; FLIK G; DUCOURET, B; HOGSTRAND, C; WENDELAAR BONGA, S.E; LOCK, R.A. (2000). Effects of copper on cortisol receptor and metallothionein expression in gills of *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology** 51 45-54
- ZAFALON-SILVA, B; ZEBRAL, Y.D; BIANCHINI, A; ROSA, C.E; MARINS, L.F; COLARES, E.P; MARTINEZ, P.E; BOBROWSKI, V.L; ROBALDO, R.B.(2017) Erythrocyte nuclear abnormalities and leukocyte profile in the Antarctic fish *Notothernia coriiceps* after exposure to short and long-term heat stress. **Polar Biol** (2017). DOI 10.1007/s00300-017-2099-y.
- ZEBRAL, Y, D.; ANNI, I.S.A.; AFONSO, S.B.; ABRIL, S, I, M.; KLEIN, R.D.; BIANCHINI, A.(2018). Effects of life-time exposure to waterborne copper on the somatotrophic axis of the viviparous fish *Poecilia vivipara*, **Chemosphere** (2018), doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.202.
- WHITE, S.L, RAINBOW, P.S (1982). Regulation and Accumulation of Copper, Zinc and Cadmium by the Shrimp *Palaemon elegans*. **MARINE ECOLOGY**. Vol. 8: 95-101, 1982.
- WINTER, M. J., ELLIS, L. C. J., & HUTCHINSON, T. H. (2007). Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 629(2), 89–99. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.01.010