

Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba

Admilson da Costa e Silva

Graduado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Patos de Minas (FAFIPA/UNIPAM)

Júlio César Nepomuceno

Professor Titular do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM)

Resumo: O teste do micronúcleo possibilita a detecção de efeitos genotóxicos provocados por vários agentes químicos e físicos, podendo ser utilizado para avaliação das condições ambientais. Os micronúcleos são estruturas originárias de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que, durante a anáfase, não migram para os pólos da célula. O presente trabalho tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos da poluição aquática em peixes do rio Paranaíba, região de Patos de Minas/ MG, por meio do teste do micronúcleo. O peixe utilizado foi o mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*), por ser comum na região, de fácil captura, além de ser consumido pela população ribeirinha. Amostras de sangue, para preparação dos esfregaços, foram obtidas por meio de punção branquial, mediante o uso de seringa e agulha. Após 24 horas os esfregados foram fixados com metanol puro durante 5 minutos, e corados com Giemsa e tampão fosfato (pH 6,8) na proporção de 1:20, durante 10 minutos. O número de micronúcleos foi determinado a partir de 2.000 eritrócitos analisados por peixe. A análise estatística dos dados foi feita pelo teste condicional para a detecção de eventos raros (PEREIRA, 1991). Verificou-se que a frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos foi significativamente maior nos peixes do rio Paranaíba que nos peixes do córrego Caxambu. Esta diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos de peixes do rio. A partir destes resultados, pode-se concluir que a alta frequência de micronúcleos nos peixes do rio se deve, provavelmente, à exposição destes a substâncias e/ou a condições ambientais de potencial genotóxico.

Palavras-chave: Peixe. Micronúcleo. Genotóxico. Teste do Micronúcleo

Abstract: The micronuclei test allows to detect hazardous effects due to various chemical and physical agents in the genetic material, and therefore may be useful for environmental assessment. The micronuclei are organic structures originated either from chromosomal fragments or entire chromosomes that during the anaphase do not migrate to the cell pole. The goal of this study is to apply this test to evaluate the effects of hazardous pollutants in the water on fishes from the Paranaíba River. Samples were collected downstream and upstream of the Paranaíba River in the region of Patos de Minas County, in the state of Minas Gerais, Brazil. We utilized the *Pimelodus maculatus* because it is a common fish in the region, it is ease to capture, and it is a major food source for riverine human population. We collected blood sample from gills, using needles. Blood spreads were fixed with pure methanol for 5 minutes, after 24 hours. The material was stained 20% Giemsa diluted in buffer phosphate (pH 6.8) for 10 minutes. The number of micronuclei was estimated from 2,000 analyzed erythrocytes for each specimen. The statistical analysis of the data was done with the conditional test for detection of rare events (PEREIRA, 1991). The frequency of

micronuclei in peripheral erythrocytes was significant higher in the fishes from the Paranaíba River than in the fishes from the Caxambu creek. No significant differences were found between the fishes from the upstream and downstream of the Paranaíba River. We concluded that the high frequency of micronuclei was caused likely by exposure to hazardous genotoxic substances and other hazardous environmental conditions.

Key words: Fish. Micronuclei. Genotoxic. Micronucleus test.

Introdução

Desde que a vida surgiu na Terra, há cerca de 3,5 bilhões de anos, a água foi fundamental como base da alimentação dos organismos e como meio de desenvolvimento de plantas e animais. Ela é tão bem aproveitada que, ao longo de milhões de anos, o mesmo estoque original em movimento alimenta rios, lagos e aquíferos ou reservatórios subterrâneos, através do ciclo hidrológico (Pegorin, 2001).

Segundo Karmann (2001), a água é a substância mais abundante na superfície do planeta, participando dos seus processos modeladores pela dissolução de materiais terrestres e do transporte de partículas. Ela cobre 70% da superfície do planeta Terra, porém é irregularmente distribuída e, de toda a água na Terra, 97,5% são salgadas e menos de 2,5% são doces. Estas estão distribuídas entre as calotas polares (68,9%), os aquíferos (29,9%), rios e lagos (0,3%) e outros reservatórios (0,9%) (HIRATA, 2001). Só o Brasil, segundo Garcia (2003), detém sozinho cerca de 12% de toda a água doce de superfície do mundo, mas a distribuição também é irregular pelo território brasileiro, com regiões como a Norte, que detém o maior volume, em contrapartida à Nordeste, em que há escassez. Há excesso em alguns lugares, falta em outros e poluição em quase toda parte. No Brasil, nas regiões Norte e Centro-Oeste, jogam-se metais tóxicos nos rios, como o mercúrio usado no garimpo. No Sul e no Sudeste são os produtos químicos dos pesticidas agrícolas e o crescente aumento do volume de esgoto em consequência à concentração urbana (PEGORIN, 2001).

A contaminação da água vem crescendo assustadoramente, sobretudo nas zonas costeiras e em grandes cidades em todo o mundo. Os rios têm sido, ao mesmo tempo, pontos de captação de água para abastecimento de áreas metropolitanas, servindo de receptores para os lançamentos de esgotos urbanos, de lixos e de efluentes agro-industriais. Em várias regiões o meio ambiente tem sido incapaz de degradar estes contaminantes e restituir o seu equilíbrio natural (HIRATA, 2001).

Figuerêdo (1999 apud ALVES, 2000) relata que a degradação das águas superficiais é causada principalmente pelos seguintes fatores: lançamento *in natura* dos esgotos domésticos, lançamento de efluentes líquidos industriais, disposição inadequada dos lixos urbanos, erosão do solo e assoreamento de material carregado e usos indiscriminados de nutrientes e defensivos agrícolas.

Uma Pesquisa Nacional de Saneamento Básico do IBGE aponta que 58,4% dos distritos do Brasil não coletam esgoto, outros 27,5% têm rede coletora de esgoto, mas não o tratam antes de lançá-lo no ambiente. Em função disso, rios que passam por centros urbanos estão quase todos poluídos (GARCIA, 2003).

Segundo Hirata (2001), os efluentes domésticos municipais têm elevadas concentrações em carbono orgânico, cloreto, nitrogênio, sódio, magnésio, sulfato e

alguns metais, incluindo ferro, zinco e cobre, além de concentrações variadas de microorganismos patogênicos.

O rio Paranaíba, importante rio brasileiro, é um rio que tem sofrido com a degradação ambiental. Com uma extensão de 1.120 km, este nasce na serra Mata da Corda, a uma altitude de aproximadamente 1.100 metros. O rio Paranaíba, depois de se juntar ao rio Grande, forma o rio Paraná; este segue rumo à bacia do Prata e daí ao oceano Atlântico. No seu percurso, o rio Paranaíba faz a divisa natural entre os Estados de Minas e Goiás (total de 580 km) e Minas e Mato Grosso do Sul (WERNECK, 1994).

Segundo Cambraia e Silva (2000), esse rio é considerado o principal recurso hídrico do Alto Paranaíba, tendo importância no abastecimento industrial e na diluição de efluentes, na pesca e piscicultura e na irrigação de culturas. Além disso, tem um grande potencial turístico e de lazer. Sua bacia é a mais densamente povoada do Estado de Minas Gerais, com população aproximada de 3,5 milhões de habitantes distribuídos nos seus 123 municípios que fazem parte desta região, trazendo como consequência uma grande pressão sobre os seus recursos naturais, principalmente os hídricos. Um destes municípios é o de Patos de Minas/MG, cidade que, assim como outras, tem o rio como principal fonte de abastecimento de água e receptor de esgotos sanitários.

Diante dos atuais problemas ambientais, somados à conscientização do homem sobre os potenciais perigos de poluentes em ambientes aquáticos, tem-se crescido o interesse no uso dos peixes como indicadores para o monitoramento de carcinógenos, teratógenos e mutágenos presentes no ambiente. Isso se deve, principalmente, pelo fato de ambientes aquáticos servirem com repositórios convenientes para dejetos biológicos e tecnológicos do homem (KRISHNAJA; REGE, 1982).

De acordo com Kligerman (1982) a Ciência da Toxicologia aquática tem-se desenvolvido no sentido de conhecer os efeitos dos impactos biológicos nos ecossistemas aquáticos. Trazendo novas informações sobre as ações antropogênicas que afetam esses ecossistemas, os peixes têm sido os organismos mais usados em tais estudos, porque são ecologicamente e economicamente importantes nesses sistemas, além do que são muito sensíveis às adversidades do ambiente. Assim, os peixes têm um papel importante nos estudos da toxicologia aquática, atuando como elementos de monitorização da poluição ambiental (HOSE *et al.*, 1987; HOOFTMAN e RAAT, 1982; DAS e NANDA, 1986).

Teste do Micronúcleo

Matter e Schmid (1971) verificaram em roedores a correlação entre aberrações cromossômicas e o aparecimento de anomalias nucleares (micronúcleos) em eritrócitos jovens, após a expulsão do núcleo. Os autores, utilizando várias doses de Trenimon, concluíram que a incidência dessa anomalia era dose dependente, e que a sensibilidade para este então chamado “teste do micronúcleo” era similar às tradicionais análises citogenéticas, considerando-o como um teste rápido e simples na detecção de mutagenicidade.

O teste do micronúcleo baseia-se na observação de células que sofrem alterações na distribuição de suas cromátides (efeito sobre o fuso) ou quebra de cromátides. Durante a anáfase, momento em que há a segregação dos cromossomos, os fragmentos provenientes das quebras e de cromossomos inteiros, e que não estão ligados pelo fuso, não acompanham a migração para os pólos da célula. Após a telófase, tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas,

formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (LEDEBUR; SCHMID, 1973). No caso de um efeito no fuso, como por exemplo, sob a influência de colchicina, há uma formação de micronúcleos bem maiores do que os que se formam sob a influência de agente clastogênico (YAMAMOTO; KIKUSHI, 1980).

Os micronúcleos são encontrados em uma grande variedade de células da medula óssea: mieloblastos, mielócitos, eritrócitos. Contudo, eles são principalmente observados nos eritrócitos policromáticos. As células policromáticas têm um curso mais vantajoso para este teste. Poucas horas após as últimas mitoses, os eritroblastos expõem seus núcleos. Por razões desconhecidas, os micronúcleos mantêm-se dentro deles, e são fáceis de serem detectados. Durante um período de 24 horas os eritrócitos jovens têm uma coloração diferenciada de outras formas. A cor desses então chamados "eritrócitos policromáticos" é azulada (LEDEBUR; SCHMID, 1973). Os eritrócitos jovens (policromáticos) coram em azul-acinzentado basofílico com Giemsa, porque ainda não perderam seus ribossomos, que perduram aproximadamente 24 horas após a enucleação. Após a dissolução dos ribossomos, a célula madura (normocromática) cora em laranja-rosa acidófilo (HEDDLE *et al.*, 1983).

O teste com eritrócitos pode ser usado como uma alternativa para o teste de aberrações cromossômicas. Uma pequena gota de sangue pode produzir milhares de células válidas para o teste, não sendo necessários processamentos especiais, e a contagem microscópica não requer um citogeneticista treinado. A uniformidade das células do sangue periférico permite uma contagem automática das anomalias nucleares satisfatoriamente. Todas estas propriedades acrescentam para a conveniência e aplicabilidade do teste (HOOFTMAN; RAAT, 1982).

Majone *et al.* (1988), verificando as diferentes técnicas de coloração para detecção de micronúcleos em moluscos marinhos (*Mytilus galloprovincialis*), concluíram que a técnica com Giemsa é mais apropriada para estudos ambientais, sendo um método confiável e mais prático comparados aos outros testes citogenéticos. Countryman e Heddle (1976), estudando a produção de micronúcleos em cultura de linfócitos humanos expostos a radiação, concluíram que o método reproduz com fidedignidade a aberração cromossômica, sendo bastante econômico, e requer uma menor habilidade ou perícia do que o método convencional de análise de metáfase, sendo ainda 10 vezes mais rápido.

Para verificar a persistência de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico, Schlegel e Macgregor (1982) retiraram amostras de sangue periférico de camundongo, tratados com agentes mutagênicos. Os resultados mostraram que eritrócitos micronucleados, induzidos por agentes mutagênicos, acumulam-se no sangue periférico, tendo uma pequena ou nenhuma remoção dessas células da circulação.

Hogstedt (1984) analisa e compara os métodos utilizados no teste do micronúcleo em linfócitos: sem a preocupação da preservação do citoplasma, e do método, onde se mantém o citoplasma do linfócito intacto. Ele conclui que o método mais preciso na identificação de micronúcleos é o da preservação do citoplasma, justificando-se pela dificuldade em diferenciar micronúcleos de núcleos fragmentados de outras células, devido à ausência de citoplasma.

De acordo com o guia para a conduta do teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de mamíferos (MACGREGOR *et al.*, 1987), uma substância a ser testada aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, indicando que ela interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, levando a um aparecimento de fragmentos da cromatina ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram aos núcleos filhos. Agentes que quebram cromossomos, ou interferem no fuso, induzem ao aparecimento de micronúcleos. Uma elevada frequência de células micronucleadas

sugere que um desses tipos de aberrações ocorreu. Quando a frequência de células micronucleadas não é elevada, pode-se concluir que os tipos de aberrações acima descritos não ocorreram nos eritroblastos, em divisão, da medula óssea, sob as condições de tratamento utilizados no teste.

Grisolia (2002) usando ciclofosfamida, mitomicina C e vários pesticidas fez uma comparação entre o teste de micronúcleos em ratos e peixes, sendo os resultados mais positivos observados em *Tilapia rendalli* do que em ratos.

Teste do Micronúcleo em Peixes

Nos últimos anos os peixes têm recebido uma atenção especial, como possíveis monitores de ambientes poluídos, objetivando assim a detecção da atividade dos agentes genotóxicos no ambiente aquático (HOOFMAN; RAAT, 1982). A utilização do peixe como organismo-teste vem da importância deste animal no estudo da toxicologia aquática, tendo em vista a sua susceptibilidade às adversidades ambientais e sua facilidade tanto na manipulação em laboratório quanto no emprego de testes citogenéticos (NEPOMUCENO, 1993).

Partindo de estudos feitos anteriormente, com micronúcleos em mamíferos, Hoofman e Raat (1982) empregaram o teste do micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico de peixe, chegando à conclusão de que o teste poderia ser usado como uma alternativa no teste de aberrações cromossômicas.

Danos mutagênicos em peixes podem ser avaliados usando-se vários métodos. Entre os métodos citogenéticos, o teste do micronúcleo em eritrócitos tem se mostrado ser simples, confiável e sensível (KLINGERMAN, 1982).

Landolt e Kocan (1983 apud HOSE *et al.*, 1987) classificaram o teste do micronúcleo como uma das mais promissoras, barata e rápida técnica, aplicável para avaliação a exposição por contaminantes para peixes marinhos e de água doce. Segundo Hose *et al.* (1987), este é aplicado independentemente de características cariotípicas, e é igualmente aplicável para qualquer espécie de peixe.

Manna *et al.* (1985), utilizando tilápias (*Oreochromis mossambica*), mostraram que a frequência de aberrações cromossômicas induzidas pela mesma dose de Raios-X, no epitélio branquial, foi mais alta do que a frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos, mas afirmaram também que é um meio rápido de detectar a presença de agentes genotóxicos no ambiente aquático.

Hose *et al.* (1987) aplicaram com sucesso o teste do micronúcleo para a detecção de micronúcleos em eritrócitos de peixes de ambientes poluídos no Sul da Califórnia. Um aumento significativo na frequência de micronúcleos em peixes coletados em ambiente contaminado, comparado com peixes coletados em locais de referência, foi observado. Neste estudo, os autores encontraram dois tipos de micronúcleos: unidos ao segmento nuclear, semelhante aos descritos por Hoofman e Raat (1982), e fragmentos isolados do núcleo, como micronúcleos de células de mamíferos.

Nepomuceno e Spanó (1992) verificaram uma elevada frequência de micronúcleos em eritrócitos circulantes de tilápias (*Oreochromis mossambicus*) provenientes das Estações de Piscicultura do IBAMA (Uberlândia/MG) e da Estação de Piscicultura da Fazenda Experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia/MG). De acordo com os autores, os resultados observados comprovam o emprego do teste do micronúcleo como sendo um instrumento de monitoramento rápido, e os peixes como biomonitores eficientes para detectar a presença de agentes genotóxicos no meio ambiente aquático.

Nepomuceno *et al.* (1997) demonstraram em *Cyprinus carpio* expostos ao mercúrio metálico, nas doses 2, 20 e 200 mg Hg/litro de água, durante um período de 159 dias, um aumento na frequência de micronúcleos nas mais altas concentrações (20 e 200 mg Hg/litro de água). Nesse estudo, os autores consideraram o teste do micronúcleo em peixes como um efetivo teste de curta duração para o monitoramento de ambientes aquáticos poluídos.

A presença de produtos químicos carcinógenos no meio ambiente vem sofrendo um crescente aumento devido à atividade humana, tanto rural e industrial quanto urbana. A detecção destes produtos e seus prováveis efeitos nos organismos são importantes no estudo do impacto que eles podem trazer às populações animal, vegetal e humana (COSTA; MENK, 2000).

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos da poluição aquática em peixes do rio Paranaíba, região de Patos de Minas/MG, por meio do teste do micronúcleo.

Material e métodos

Neste trabalho foram utilizados peixes da espécie *Pimelodus maculatus*, por ser uma espécie comum na região e de fácil captura. Esta espécie é popularmente conhecida por mandi-amarelo.

Os peixes foram coletados no rio Paranaíba, à montante e à jusante da cidade de Patos de Minas/MG, e no córrego Caxambu, município de Lagamar/MG. No rio Paranaíba foram coletadas duas amostras de peixes: uma amostra 1000 metros acima do primeiro ponto de lançamento de efluentes da cidade no rio e outra a 500 metros abaixo do último ponto de lançamento de efluentes. A amostra de peixes coletados no córrego Caxambu foi composta por onze peixes de ambos os sexos. A amostra de peixes coletada no rio, à montante, foi composta de seis peixes, e a amostra coletada à jusante foi composta de dez peixes, também de ambos os sexos. As amostras de peixes do rio constituíram os grupos de estudo.

De cada peixe capturado foi feita a coleta de sangue periférico para confecção de esfregaços em lâminas (duas por peixe); em seguida, os peixes foram devolvidos ao seu habitat. O sangue foi obtido conforme metodologia descrita por Nepomuceno (1993). Esta metodologia consiste em fazer uma punção na região branquial, região rica em vasos sanguíneos. O toque com biseu da agulha nas lâminas branquiais provoca um pequeno sangramento, em que se obtém uma gota de sangue necessária para a confecção do esfregaço sanguíneo.

A agulha e a seringa, empregadas na coleta, foram as mesmas para todos os peixes. Porém, procedeu-se uma rápida lavagem com solução fisiológica após a coleta do sangue de cada peixe. Nepomuceno (1993), usando esta técnica em estudos com tilápias, relatou que nenhuma estrutura semelhante a tipo celular, muito menos hemácias, foi encontrada. Também não foi utilizado anticoagulante, pois o sangue era rapidamente colocado sobre a lâmina e, posteriormente, distendido sobre a mesma.

As amostras de sangue foram fixadas 24 h após a coleta com metanol puro por 5 minutos; posteriormente estas amostras foram então coradas com Giemsa e tampão fosfato (pH 6,8) na proporção de 1:20, durante 10 minutos. Estas amostras de sangue foram analisadas no microscópio óptico de luz, com aumento da objetiva de imersão (100 X).

O número de micronúcleos (MN) e de células micronucleados (CMN) foi determinado a partir de mil (1000) eritrócitos por lâmina. As lâminas foram codificadas

e numeradas usando teste cego, sendo analisados um total de dois mil (2000) eritrócitos por peixe.

A análise estatística dos dados foi feita de acordo com o teste condicional para a detecção de eventos raros (PEREIRA, 1991), por meio do qual é possível dizer se a diferença na frequência de micronúcleos entre os grupos é significativa.

O número de eritrócitos analisados, utilizando peixes como biomonitor, é bastante variado: Hooffman e Raat (1982) utilizaram 5000 eritrócitos por animal; Das e Nanda (1986) analisaram 4000 eritrócitos por animal; Hose *et al.* (1987) utilizaram 1000 eritrócitos por animal; Nepomuceno (1993) analisou 6000 eritrócitos por animal e Grisolia (2002) utilizou 3000 eritrócitos por animal.

Resultados e discussão

O número de micronúcleos e de células micronucleadas foi mais elevado nos grupos amostrados no rio Paranaíba do que no grupo amostrado no córrego Caxambu, local de referência (Tabela 1). O mesmo é observado para a frequência média de micronúcleos e células micronucleadas, expressa por mil. A frequência média micronúcleos e de células micronucleadas no grupo amostrado à jusante do rio foi menor que a frequência média no grupo amostrado à montante. A incidência de micronúcleos foi 4,8 e 4,5 vezes maior nos grupos do rio, à montante e à jusante, que no grupo amostrado no córrego, respectivamente.

A análise estatística dos resultados demonstrou que a frequência de micronúcleos e células micronucleadas foi significativamente maior nos grupos amostrados no rio, à montante e à jusante, quando comparado com o grupo amostrado no córrego Caxambu (Figura 1). O grupo de peixes amostrado à montante da cidade de Patos de Minas apresentou maior incidência de micronúcleos do que o grupo amostrado à jusante da mesma cidade. No entanto, esta diferença não foi significativa. Os níveis de significância descritos para todas as comparações tiveram valor de $P < 0,05$, evidenciando o potencial genotóxico do meio ambiente aquático do rio.

Tabela-1 Frequência de micronúcleos (MN) e células micronucleadas (CMN) %o em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) coletados no córrego Caxambu (1) e no rio Paranaíba à montante (2) e à jusante (3) da cidade de Patos de Minas/MG.

Local	Nº. de indivíduos	Total de células	Total de MN	Total de CMN	X (%o) \pm SD MN	CMN
Córrego Caxambu (1)	11	22000	56	55	2,5 \pm 1.01	2,5 \pm 1.06
Rio Paranaíba (2)	6	12000	144*	144*	12 \pm 3.38	12,0 \pm 3.38
Rio Paranaíba (3)	10	20000	226*	222*	11,3 \pm 3.74	11,1 \pm 3.52

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo amostrado no córrego Caxambu ao nível de significância $\alpha = 0,05$.

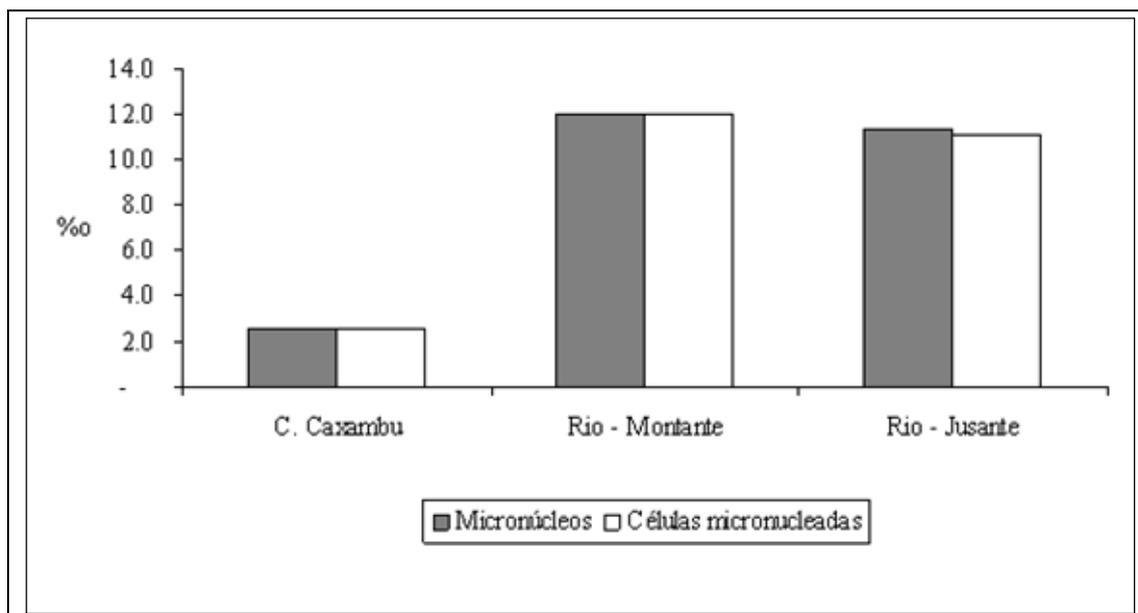


Figura 1. Frequência de micronúcleos e células micronucleadas (%o) em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) coletados no córrego Caxambu (1) e no rio Paranaíba à montante (2) e à jusante (3) da cidade de Patos de Minas, MG.

A diferença significativa encontrada entre os grupos de peixes amostrados no rio Paranaíba e o grupo amostrado no córrego Caxambu, evidencia a presença de substâncias e ou condições ambientais com potencial genotóxico, capaz de causar dano ao material genético dos peixes.

Hose *et al.* (1987), Saotome e Hayashi (2003) e Bucker e Conceição (2004), em trabalhos semelhantes, utilizando o teste do micronúcleo em outras espécies de peixes e locais, também obtiveram resultados positivos conforme descrito a seguir: Hose *et al.* (1987) observaram, em sua pesquisa com peixes no sul da Califórnia, um aumento significativo na frequência de micronúcleos dos peixes coletados em ambiente contaminado, comparado com peixes coletados em locais de referência, ou seja, sem poluentes; Saotome e Hayashi (2003) obtiveram resultados positivos em estudo de indução de micronúcleos em *Hemicentrotus pulcherrimus* exposto às águas poluídas da baía de Tóquio, em condições de laboratório. Amostras de água da Bacia de Tóquio induziram micronúcleos numa frequência variando de 3,8 a 24,8%; Bucker e Conceição (2004), empregando o teste do micronúcleo em eritrócitos periféricos de tilápias juvenis (*Oreochromis mossambicus*) expostas às águas do rio Itajaí-Açú/SC, usando tanques de 500 l e diferentes tempos de exposição (Tempo Zero T0, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 10 dias de exposição), observaram uma diferença significativa no número de micronúcleos quando comparado ao controle negativo (T0).

Os eritrócitos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) analisados apresentavam-se, em sua maioria, de forma circular, com núcleos ovalados e centralizados no citoplasma. Isto tornou mais fácil a contagem dos micronúcleos e das células micronucleadas. Foram observados micronúcleos quase unidos ao núcleo e separados do mesmo, dispersos pelo citoplasma da célula e com tamanhos semelhantes aos descritos por Hose *et al.* (1987), ao analisarem eritrócitos periféricos de peixes coletados em áreas contaminadas no sul da Califórnia, e aos descritos por Hoofman e

Raat (1982), ou seja, micronúcleos unidos ao segmento nuclear e fragmentos isolados do núcleo, como micronúcleos de células de mamíferos.

A identificação de substâncias potencialmente genotóxicas não foi objeto deste estudo, mas a presença de substâncias e condições ambientais que podem ter tal efeito é relatado em trabalhos de monitoramento das águas do rio Paranaíba.

De acordo com a Fundação Estadual do Meio Ambiente, em 2000, as águas do rio Paranaíba, à jusante da cidade de Patos de Minas, apresentavam um índice de qualidade ruim. A contaminação por tóxicos era média e com ocorrência acima dos limites toleráveis para classe de: cobre, coliformes fecais, fosfato total, manganês e turbidez. O índice de qualidade da água, o IQA, reflete a contaminação por esgotos e outros materiais orgânicos, por nutrientes e por sólidos. Já a contaminação por tóxicos é avaliada considerando-se os seguintes componentes: amônia, arsênio, bário, cádmio, chumbo, cianetos, cobre, cromo hexavalente, índice de fenóis, mercúrio, nitritos e zinco. Em função das concentrações observadas, a contaminação é caracterizada como baixa quando (< 20%), média (20 a 100%) ou alta (> 100%) (FEAM, 2004).

Caixeta (2002), avaliando as propriedades físicas, químicas e biológicas das margens do rio Paranaíba, afim de um diagnóstico científico de degradação ambiental, constatou: ausência da vegetação ciliar em vários pontos; presença de lixo de maneira esparsa no leito do rio; espumas amarelas e brancas não naturais; e existência de microorganismos indicadores de poluição fecal (bactérias do grupo coliforme) nas proximidades dos emissários de esgoto. Também foi constatada a existência de vinte e dois (22) emissários de esgoto neste trecho, sendo que dois são os córregos Fátima Porto e Cadeia.

Cambraia e Silva (2000) também observaram que em alguns pontos do rio, próximos aos emissários de esgoto, foram obtidos resultados abaixo de 5 mg/L para análises de OD (Oxigênio dissolvido) da água do rio Paranaíba, o que de acordo com a deliberação normativa do COPAM 010/86 torna-a inviável ao desenvolvimento de organismos aquáticos. Quanto aos resultados de DQO (Demanda Química de Oxigênio), estes autores concluíram que as águas estão contaminadas por dejetos advindos de esgoto. A média encontrada foi de menos que 5 mg/L, o que é indicativo de contaminação.

Outra fonte de contaminação do rio que pode ter um efeito genotóxico sobre os peixes seria a contaminação por agrotóxicos, em função de seu uso indiscriminado. Segundo o engenheiro agrônomo Vargas, de Patos de Minas, este é mais um dos problemas presentes na bacia do rio Paranaíba (WERNECK, 1994).

Metcalfe (1989 apud BUSS *et al.*, 2003) relata que o uso das respostas biológicas como indicador de degradação ambiental é vantajoso em relação às medidas físicas e químicas da água, pois estas registram apenas o momento em que foram coletadas, como uma fotografia do rio, necessitando assim de um grande número de análises para a realização de um monitoramento temporal eficiente. De acordo com Buss *et al.* (2003), mesmo em casos de lançamentos contínuos, dentro das normas estabelecidas por lei, o uso da biota aquática é uma importante ferramenta na avaliação da qualidade da água. Isso se deve a um processo natural denominado biomagnificação, que é a transmissão de compostos que não são metabolizados ou excretados pelos organismos para o nível superior da cadeia trófica. Em alguns casos, esses compostos podem ser tóxicos se acumulados, como no caso de metais pesados e de pesticidas organoclorados. Portanto, mesmo estando dentro das normas legais de lançamento, esses efluentes podem estar degradando as inter-relações biológicas, extinguindo espécies e gerando problemas de qualidade de vida para as populações que utilizam aquele recurso.

Devido à baixa sensibilidade do teste e aos resultados verificados neste estudo, pode-se considerar que a concentração de agentes clastogênicos e aneugênicos,

presentes na água do rio Paranaíba é alta, induzindo frequências de micronúcleos de 12,0 ‰ e 11,3‰ nos grupos amostrados à montante e à jusante, respectivamente. Valores estes estatisticamente significativos quando comparados com a frequência de micronúcleos do grupo amostrado no córrego Caxambu (2,5‰). Isto mostra a importância dos peixes no biomonitoramento ambiental e comprovam o emprego do teste do micronúcleo como um instrumento de monitoramento rápido e fácil, corroborando com Hose *et al.* (1987), que afirmam ser o teste do micronúcleo um teste rápido e uma ferramenta para monitoramento e detecção da presença de agentes genotóxicos no ambiente.

Conclusões

O teste do micronúcleo, utilizando o peixe mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*), mostrou-se um teste rápido e prático para o monitoramento da poluição de ambientes aquáticos.

A frequência de micronúcleos, significativamente superior nos peixes do rio Paranaíba, evidencia a presença de substâncias poluentes capazes de causar dano ao material genético destes peixes.

Agradecimentos

À Polícia Especializada do Meio Ambiente de Minas Gerais (PMMG), pelo apoio técnico em algumas etapas do estudo.

Referências

ALVES, Schirley Cavalcante. A água como elemento fundamental da paisagem em microbacias. *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, v. 21, n. 207, p. 9-14, 2000.

BUCKER, Augusto e CONCEIÇÃO, Moisés B. da. Avaliação da genotoxicidade por frequência de micronúcleos em eritrócitos de tilápias expostas às águas dos rios Itajaí-Açú e Itajaí-Mirim, Santa Catarina – Brasil. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA*, 8, 2004, Florianópolis. *Resumos...* Florianópolis: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia – SETAC, 2004.

BUSS, Daniel Forsin; BAPTISTA Darcílio Fernandes; NESSIMIAN, Jorge Luiz. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Cad. Saúde Pública*. vol. 19, n.º. 2, Rio de Janeiro, Mar./Apr. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.org/>. Acesso em: 13 jun. 2004.

CAIXETA, Ediene. *Condições ambientais das margens do Rio Paranaíba do perímetro urbano de Patos de Minas, MG*. 2002. 46 f. Monografia – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Centro Universitário de Patos de Minas, UNIPAM, Patos de Minas, 2002.

CAMBRAIA, José Dácio; SILVA, João Ferreira da. Expedição científica ao rio Paranaíba. *Relatório*. Patos de Minas, fev. 2000.

COSTA, Renata Maria Augusto da; MENK, Carlos Frederico Martins. *Biomonitoramento de mutagênese ambiental: emprego de plantas transgênicas em mutagênese ambiental*. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio12/12_e.asp. Acesso em: 02 nov. 2004.

COUNTRYMAN, P.I.; HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Res.* n. 41, p. 321-332, 1976.

DAS, R. K.; NANDA, N. D. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin-c and paper mill effluent. *Mutation Res.* N. 175, p. 67 - 71, 1986.

FEAM - Fundação Estadual do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.feam.br>. Acesso em: 15 nov. 2004.

GARCIA, Rafael. Sede global. *Galileu*. Dossiê. São Paulo, n. 140, p. 43 - 54, mar. 2003.

GRISOLIA, Cesar Koppe. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Res.* n 518, p. 145-150, 2002.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MacGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity - A report of the U. S. *Mutation Res.* n. 123, p. 61-118, 1983.

HIRATA, Ricardo. Recursos Hídricos. In: TEIXEIRA, Wilson; TOLEDO, M. Cristina Motta de; FAIRCHILD, Thomas Rich; TAIOLI, Fabio. *Decifrando a terra*. São Paulo: Oficina de Textos, 2001. cap. 20, p. 421 - 444.

HOGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutation Res.* n. 130, p. 63-72, 1984.

HOOFTMAN, Ria N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Res.* n. 104, p. 147-152, 1981.

HOSE, Jo Ellen; CROSS, Jeffrey N.; SMITH, Steven G.; DIEHL, Dario. Elevated circulating erythrocytes micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. *Marine Environmental Research.* N. 22, p. 167-176, 1987.

KARMANN, Ivo. Ciclo da água, água subterrânea e sua ação geológica. In: TEIXEIRA, Wilson; TOLEDO, M. Cristina Motta de; FAIRCHILD, Thomas Rich; TAIOLI, Fabio. *Decifrando a terra*. São Paulo: Oficina de Textos, 2001, cap. 7, p. 113-138.

KLIGERMAN, A. D. Fishes as biological detector of the effects of genotoxic agents, In *Mutagenicity: New Horizons in Genetics Toxicology*. Academic Press. New York, 1982, p. 435-455.

KRISHNAJA, A. P.; REGE, M. S. Induction of chromosomal aberrations in fish *Boleophthalmus dussumieri* after exposure in vivo to mitomycin C and heavy metals mercury, selenium and chromium. *Mutation Res.* n. 102, p. 71-82, 1982.

LEDEBUR, M ; SCHMID, W. The micronucleus test. Methodological Aspects. *Mutation Res.* n. 19, p. 109-117, 1973.

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARCOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Res.* n. 189, p. 103-112, 1987.

MAJONE, F.; BELTRAME, C.; BRUNETTI, R. Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different staining techniques after treatment with zinc chloride. *Mutation Res.* n. 209, p. 131-134, 1988.

MANNA, G. K.; BANERJEE, G.; GUPTA, S. Micronucleous test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish, *Oreochromis mossambica*. *The Nucleus.* n. 28, p. 176-179, 1985.

MATTER, B ; SCHMID, W. Treninon - induced chromosomal damage in bone - marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutation Res.* n. 12, p. 417-425, 1971.

NEPOMUCENO, J. C. *Detecção de eritrócitos micronucleados em peixes expostos ao mercúrio metálico.* 1993. 119 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Genética Aplicada) – Universidade de Brasília. Brasília, 1990.

NEPOMUCENO, J.C., FERRARI, I., SPANÓ, M.A.; CENTENO, A.J. Detection of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of *cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury. *Env. and Mol. Mutation*, n. 30, p. 293-297, 1997.

NEPOMUCENO, J. C; SPANÓ, M. A. Incidência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de tilápias (*Oreochromis mossambicus*) providas de diferentes estações de piscicultura. *R. Cent. Ci. Bioméd. Univ. Fed. Uberlândia*, v. 8, n. 1, p. 7-15, dez. 1992.

PEGORIN, Flávia. Água, está na hora de poupar. *Galileu.* Dossiê. São Paulo, n 119, jun. 2001.

PEREIRA, C. A. B. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e Critérios de Avaliação. *R. Bras. Genética*, p. 113-121, 1991.

SAOTOME, Kyoko; HAYASHI, Makoto. Application of a sea urchin micronucleus assay to monitoring aquatic pollution: influence of sample osmolality. *Mutagenesis.* v. 18 n. 1, p. 73-76, 2003.

SCHLEGEL, R.; MacGREGOR, J.T. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes : detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutation Res.* 104: 367-369, 1982.

WERNECK, Gustavo. Paranaíba, rio salvo pela própria natureza. *Estado de Minas*. Belo Horizonte, 24 abr. 1994. *Meio Ambiente*, p. 16.

YAMAMOTO, K.I.; KIKUSHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res.* 71; 127-131, 1980.