

ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE EXEMPLARES DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS E CONCENTRAÇÕES DE CO₂

Vanessa Duarte de ARAÚJO¹; José Gadelha de SOUZA NETTO²;
Marise Margareth SAKURAGUI³; Vera Maria Fonseca de Almeida e VAL⁴.

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Colaborador MESTRANDO/FAPEAM/BADPI/INPA; ³Coorientadora PÓS-DOC/CAPES/LEEM/INPA; ⁴Orientadora CBIO/INPA.

1. Introdução

Se as tendências de crescimento das emissões de gases de efeito estufa se mantiverem, os modelos climáticos indicam que poderá ocorrer aquecimento superior a 6°C em algumas regiões do globo até 2100. É provável que a temperatura média global aumente entre 2,0°C e 4,5°C, com uma melhor estimativa de cerca de 3,0°C, e é muito improvável que seja inferior a 1,5°C (IPCC, 2007). Sendo assim, um aumento considerável nos níveis de CO₂ na água ocasionará um estresse fisiológico em algumas espécies de peixes que poderão apresentar dificuldades respiratórias, perturbações do equilíbrio ácido-base e osmorregulatórios, entre outros e, associado a isto, atraso no crescimento, redução na eficiência alimentar, aumento na incidência de doenças e aumento na taxa de mortalidade (Boyd, 1990). O peixe escolhido como modelo para o presente estudo foi o tambaqui, *Colossoma macropomum*, por ser uma espécie de peixe nativa da bacia amazônica e sua carne ser muito apreciada como alimento pela população local, de fácil manuseio e manutenção em laboratório. Aspectos da sua fisiologia, genética, bioquímica e ecologia já foram descritos na literatura especializada (Saint-Paul, 1983; Val & Almeida-Val, 1995; Wood *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 2010). Além disso, o tambaqui tem sido utilizado como espécie alvo em estudos sobre efeito do pH (Wood *et al.*, 1998; Aride *et al.*, 2007), da hipóxia (Val, 1995; Chippari-Gomes *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2010) e da temperatura nos parâmetros fisiológicos (Moura *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2001). Desta forma, o objetivo desse trabalho foi simular o aumento de temperatura e concentração de CO₂ proposto pelo modelo climático do IPCC e analisar se essa alteração climática poderá causar nas primeiras 24 horas de exposição danos genéticos e de integridade celular nas células eritrocitárias de exemplares de tambaqui.

2. Material e Métodos

Os exemplares de tambaqui foram adquiridos na piscicultura da Fazenda Santo Antônio, rodovia AM-010, Km 84 e transportados ao laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os peixes foram aclimatados por um período de 30 dias em tanques de 1000 litros, dotados de sistema de aeração permanente e filtro biológico e alimentados com ração comercial (36% de proteína). Após esse período, os peixes foram divididos em dois grupos de 8 animais cada: Controle e Experimental, os quais foram dispostos em 4 caixas plásticas (com dois peixes por cada caixa) dentro de um banho maria com temperatura e nível de CO₂ previamente estabelecidos. O grupo Controle foi mantido nas mesmas condições do meio ambiente (28°C e 20 ppm CO₂) e o Experimental foi exposto a temperatura de 32°C e 120ppm CO₂ na água com o auxílio de um termostato acoplado a um mergulhão e uma Bomba de Wösthoff. A água foi previamente aquecida em um tanque mãe de 150 litros até atingir a temperatura de 32°C, em seguida a água foi substituída gradativamente (0,5 °C por hora) no banho maria no qual continha uma bomba que circulava água em uma coluna saturada contendo 10% de CO₂ e 21% de O₂. A saturação na coluna foi feita com auxílio de uma Bomba de Wösthoff. A água circulava nessa coluna e entrava individualmente nas quatro caixas experimentais e voltava de novo para o banho maria que continha 3 termostatos para manutenção da temperatura (sistema fechado com circulação). Foram feitas cinco repetições de cada experimento. Para simular uma exposição aguda dos peixes às previsões ambientais do IPCC, o tempo de exposição foi de vinte e quatro horas, sendo amostrados 2 animais de cada caixa e por grupo nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas em cada repetição (N=10). Para os

grupos controle (28°C e 20 ppm CO₂) e experimentais (36°C e 120 ppm CO₂) foram mantidos os mesmos procedimentos do desenho experimental descrito acima.

As medidas das características físico-químicas da água foram efetuadas durante a execução dos experimentos. O pH foi monitorado utilizando-se um pHmetro, as medidas de temperatura e de oxigênio dissolvido com o auxílio de oxímetro e o CO₂ foi determinado pelo método descrito por Boyd & Toker (1992). Após o término dos experimentos os peixes foram pesados, medidos, enrolados em pano úmido e o sangue foi retirado por punção caudal. Parte do sangue foi utilizada para a elaboração de lâminas com extensões sanguíneas, as quais foram coradas com GIEMSA e as análises das Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ANE) foram feitas de acordo com a metodologia descrita por Pacheco e Santos (1998) com algumas modificações. Foram analisadas 1000 células adultas de cada indivíduo no microscópio de luz (aumento 100X). Segundo Carrasco & Noaa (1990) as lesões nucleares dividem-se em quatro categorias: micronúcleo (M), núcleo lobado (L), núcleo segmentado (S) e núcleo em forma de rim (K). Em seguida, foi realizado o Ensaio Cometa, que consiste em uma técnica rápida e sensível de quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA celular. O teste indica a quantidade de quebras de DNA e é útil para a previsão de efeitos genotóxicos (Gucheva e Henriques, 2001; Raiaguru e Suba, 2003). Este teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Singh *et al.* (1988). Uma alíquota de sangue foi previamente tratada, disposta em lâminas cobertas com agarose e colocada em uma cuba vertical com solução de lise gelada. Após 2h, foi realizada uma corrida eletroforética. Ao término dos procedimentos as lâminas foram coradas com nitrato de prata. Através de microscopia de luz, foram contados 100 nucleóides em cada lâmina sendo observados o comprimento total da cauda que se formou no cometa e a porcentagem (%) da frequência de células lesadas, classificadas visualmente de acordo com o tamanho da cauda como: sem danos – classe 0 e classes 2, 3 e até danos máximos – classe 4. Assim, o grupo estudado pode ir de zero (100 X 0, ou seja, 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4, ou seja, 100 células observadas com danos máximos).

3. Resultados e Discussão

As porcentagens das anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) mostraram-se maiores nos grupos experimentais 32°C (Fig. 1) e 36°C (Fig. 2) em comparação aos seus respectivos controles 28°C, sendo que, nos grupos que foram expostos à 36°C essas anormalidades foram consideradas significativas em todos os tempos amostrais ($p < 0,05$).

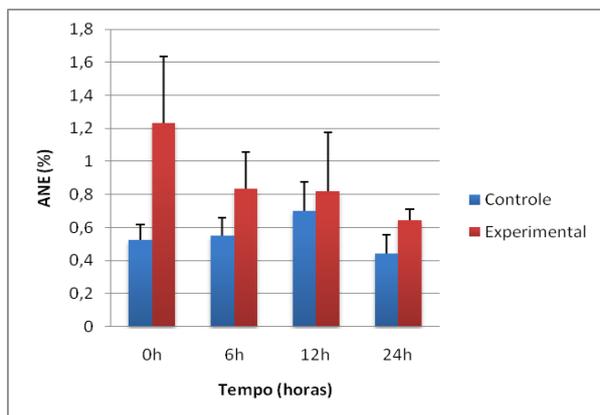


Fig. 1 Porcentagem de ANE em exemplares de *C. macropomum* dos grupos Controle (28 °C e 20ppm CO₂) e Experimental (32 °C e CO₂ 120 ppm).

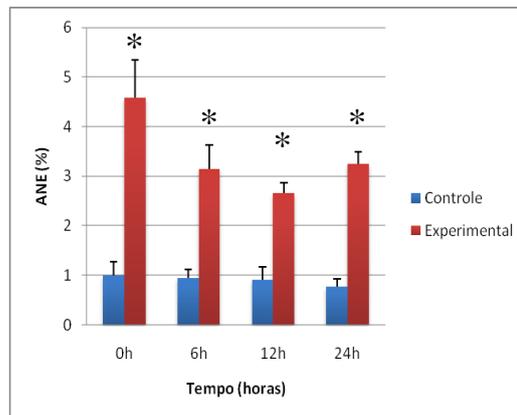


Fig. 2 Porcentagem de ANE em exemplares de *C. macropomum* dos grupos Controle (28 °C e 20ppm CO₂) e (36 °C e CO₂ 120 ppm).

A exposição da espécie *Colossoma macropomum*, por um período de 24h ao aumento de temperatura (32°C) e CO₂ (120 ppm) mostrou danos no DNA no tempo 12 e 24 horas de exposição em relação ao grupo controle (28 °C) e CO₂ (20 ppm) ($p < 0,05$), enquanto que, para o grupo que foi exposto ao aumento de temperatura maior (36°C) e CO₂ (120 ppm) essa alteração ocorreu em 0 e 24h de exposição, demonstrando que as células eritrocitárias respondem rapidamente ao aumento gradual (período de 4 a 5 horas para atingir a temperatura experimental e a saturação de CO₂ na coluna = tempo 0h de exposição). Essas lesões primárias no DNA eritrocitário (consideradas reversíveis) também foram observadas em *Prochilodus lineatus* expostos inicialmente por 6 horas à fração solúvel do óleo diesel (Vanzella, 2007). A classe de danos é mostrada na Fig. 3 e a média da frequência de danos nas Fig. 4 (32°C) e Fig. 5 (36°C).

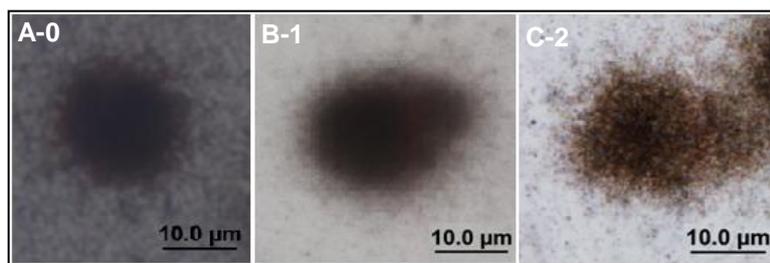


Fig. 3 Classe de danos observada *C. macropomum* exposta ao aumento de temperatura (32° C e 36° C) e CO₂ (120 ppm) em A. Classe 0 – sem danos; B. Classe 1 – com danos mínimos e C. Classe 2 – danos médios. Barra de escalas em µm.

Geralmente, o ensaio cometa é utilizado em testes de laboratório onde os animais são expostos a estresse tóxico na água, como metais de transição, pesticidas, compostos de petróleo, ou coletados na natureza para serem utilizados como bioindicador de contaminação ambiental (Nacci *et al.*, 1996; Mitchelmore & Chipman, 1998; Cotelle & Ferard, 2003; Kammann *et al.*, 2000; Lee & Steinert, 2003; Frenzilli *et al.*, 2004, Vanzella *et al.*, 2007) e outros como a exposição a radiação UV e hipóxia (Groff *et al.*, 2010), e diferentes temperaturas (25°C e 37°C) com a exposição a metil metanosulfonato (MMS) (Andrade, *et al.*, 2004). Difícilmente são encontrados na literatura trabalhos com genotoxicidade e estresse não tóxico como o de Malev *et al.* (2010) que expos, por sete dias, a espécie de água doce *Astacus leptodactylus* (crayfish) ao aumento de temperatura (25 °C e 30 °C) e à exposição ao ar por 24 h, além da privação de alimento por duas semanas, concluindo que apenas o estresse causado pelo aumento da temperatura foi capaz de induzir o aumento de danos ao DNA em *A. leptodactylus*, enquanto a privação de alimento e a exposição ao ar não causaram efeitos genotóxicos significativos.

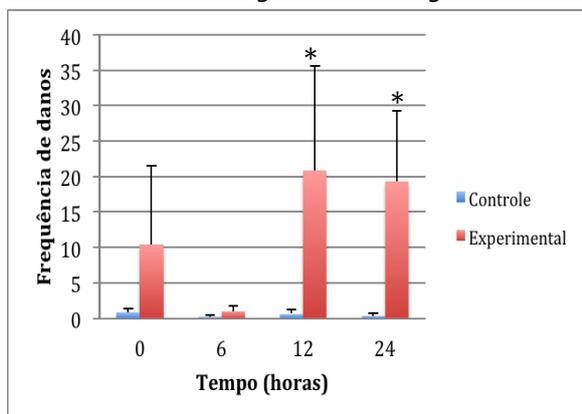


Fig. 4 Frequência de danos de exemplares de *C. macropomum* dos grupos Controle (28 °C e 20 ppm CO₂) e Experimental (32 °C e CO₂ (120 ppm)). * - indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo Controle ($p < 0,05$).

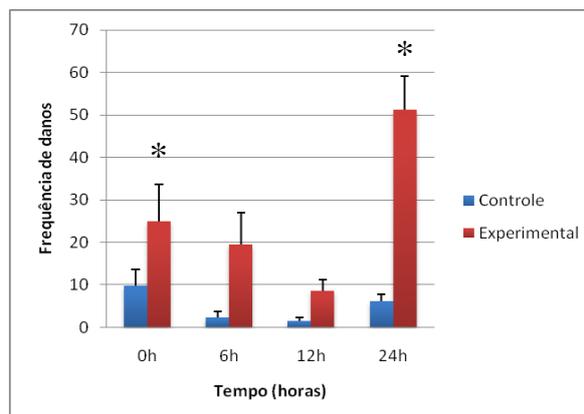


Fig. 5 Frequência de danos de exemplares de *C. macropomum* dos grupos Controle (28 °C e 20 ppm CO₂) e Experimental (36 °C e CO₂ (120 ppm)). * - indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo Controle ($p < 0,05$).

4. Conclusão

São necessárias de 12 a 24 horas para que ocorram danos significativos ao DNA nos eritrócitos em *C. macropomum* quando exposto ao aumento de temperatura e CO₂. Os resultados indicam que, nos níveis testados, o aumento da temperatura e CO₂, são capazes de induzir danos genotóxicos e também mutagênicos (formação de micronúcleos) a curto prazo, danos estes considerados irreversíveis nos eritrócitos de *C. macropomum*. A análise das anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE), assim como, o teste do ensaio cometa utilizando células eritrocitárias mostrou-se uma ferramenta sensível para detectar danos genéticos. A análise conjunta destes dados confirma que o ciclo celular nos eritrócitos desta espécie está em torno de 12 horas e que os intervalos de amostragem de 12 e 24 horas são os mais adequados para estudos de mutagenicidade. As alterações genéticas detectadas no presente estudo podem levar a uma menor sobrevivência dos exemplares afetados ou ao desenvolvimento de doenças degenerativas, como neoplasias.

5. Referências

- Andrade, V.M.; Freitas, T.R.O.; Silva, J. 2004. Comet assay using mullet (*Mugil sp*) and sea catfish (*Netuma sp*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Res.* 560: 57-67.
- Aride, P. H. R., Roubach, R. and Val, A. L. 2007. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*, 38: 588-594.
- Boyd, C.E. 1990. *Water Quality in Ponds for Aquaculture*. Alabama Agricultural Experiments Station, Auburn University, Alabama, U.S.A., 482 p.
- Boyd, C.E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn: Auburn University, 183p.
- Carrasco, K. R.; NOAA; N.A.T.L. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an insitu biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47 (11): 2123-2136.
- Chippari-Gomes, A.R.; Gomes, L.C.; Lopes, N.P.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 2005. Metabolic adjustments in two Amazonian Cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part B. 141: 347-355.
- Cotelle, S.; Ferard, J.F. 2003. Comet assay in genetic ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246-255.
- Duarte, R. M.; Honda, R. T.; Val, A. L., 2010. Acute effects of chemically dispersed crude oil on gill ion regulation, plasma ion levels and haematological parameters in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquatic Toxicology*, volume 97, Issue 2, Pages 134-141.
- Ferreira, M. S.; Oliveira, A. M.; Val, A. L., 2010. Velocidade crítica de natação (Ucrit) de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exposição à hipóxia. *Acta Amazônica*. VOL. 40(4), 699 – 704 p.
- Frenzilli, G.; Scarcelli, V.; Barga, I. D.; Nigro, M.; Frilin, L.; Bolognesi, C.; Sturve, J. 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Mutation Res.*, v. 552, p.187-195.
- Groff, A. A.; Silva, J.; Nunes, E. A.; Ianistcki, M.; Guecheva, T. N.; Oliveira, A. M.; Oliveira, C. P. F.; Val, A. L.; Henriques, J. A. P., 2010. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 99, 93-99.
- Guecheva, T., J. A. P. Henriques, *et al.* 2001. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutation Research*, v.497, p.19-27.
- IPCC Climate Change 2007. Summary for policymakers. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. pp.801

- Kammann, U.; Riggers, J.C.; Theobald, N.; Steinhart, H. 2000. Genotoxic potential of marine sediments from the north sea. *Mutation Res.* 467: 161- 168.
- Lee, R.F.; Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Res.* 544: 43-64.
- Malev, O.; Srut, M.; Maguire, I.; Stambuk, A.; Ferrero, E. A.; Klobucar, S. L.; Goran, I.V. 2010. *Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish Astacus leptodactylus*. Original Research Article. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 152, Issue 4, Pages 433-443.
- Mitchelmore, C.L.; Chipman, J.K. 1998. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquatic Toxicology* 41: 161-182.
- Moura, M.; Farias, I. P.; Val, A. L. 1994. Temperature effects on leukocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Brazil. 27: 1589-1598.
- Nacci, D.E.; Cayula, S.; Jackim, E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology* 35: 197-210.
- Oliveira, A.M.; Val, A.L.; Chagas, E.C.; Roubach, R. 2001. *Efeito da temperatura sobre os parâmetros hematológicos de Colossoma macropomum alimentado com vitamina C*. Relatório apresentado ao PIBIC. INPA/FUA. Manaus-Am.
- Pacheco, M.; Santos, M. 1998. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on juvenile eel (*Anguilla anguilla*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38: 252-259.
- Raiaguru, P.; S. Suba. 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 41: 85-91.
- Saint-Paul, U. 1983. Investigations on the respiration of the Neotropical fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae). The Influence of weight and temperature on the routine oxygen consumption. *Amazoniana*. 7: 433-443.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Val, A. L. 1995. Oxygen transfer in fish: Morphological and molecular adjustments. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 28: 1119-1127.
- Val. A. L. e Almeida-Val. V. M. F. 1995. *Fishes of the Amazon and their environment. Physiological and Biochemical Aspects*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 04: 004.
- Wood, C.M.; Wilson, R.W.; Gonzalez, R.J.; Patrick, M.L.; Bergman, H.L.; Narahara, A.; Val, A.L. 1998. Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*) to low pH and extremely soft water. *Physiological Zoology* 71: 658-670.