

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O DESENVOLVIMENTO
GONADAL COM A FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS
E DE NÚCLEOS MORFOLOGICAMENTE ALTERADOS
EM ERITRÓCITOS DE PACUS (*Piaractus mesopotamicus*)
CAPTURADOS NO RIO AQUIDAUANA - MS - BRASIL**

ÉDER DITTMAR

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
DEZEMBRO DE 2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O DESENVOLVIMENTO
GONADAL COM A FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS
E DE NÚCLEOS MORFOLOGICAMENTE ALTERADOS
EM ERITRÓCITOS DE PACUS (*Piaractus mesopotamicus*)
CAPTURADOS NO RIO AQUIDAUANA - MS - BRASIL**

ÉDER DITTMAR

Orientador: Prof. Dr. Helder Luna

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área Concentração: Produção Animal.

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2005**

SUMÁRIO

“Página”

LISTA DE TABELAS	2
1. INTRODUÇÃO	3
a. Micronúcleos	3
b. Relação Gonadossomática	8
2. REFERÊNCIAS.....	9
3. ARTIGO CIENTÍFICO	14
ASSOCIAÇÃO ENTRE O DESENVOLVIMENTO GONADAL COM A FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE NÚCLEOS MORFOLOGICAMENTE ALTERADOS EM ERITRÓCITOS DE PACUS (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) CAPTURADOS NO RIO AQUIDAUANA, MS, BRASIL	
3.1. Resumo	14
3.2. Abstract	15
4. INTRODUÇÃO	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1. Local da Captura	17

5.2. Relação Gonadossomática	17
5.3. Micronúcleos.....	18
5.4. Distribuição de Classes de Relação Gonadossomática.....	18
5.5. Análise Estatística.....	19
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
8. REFERÊNCIAS.....	24
9. ANEXOS.	26

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai-Mãe, a Grande Fraternidade Branca e ao Dr. William, médico de minha alma, pelo amparo e conforto espiritual;

A meus pais Júlio Pereira Dittmar e Juracy Echeverria Ocampos, que deram-me a vida iluminando meus caminhos com amor e dedicação;

A esposa Mairla, por seu amor, incentivo e compreensão nos momentos difíceis;

A Yan Visintin Valério, o afilhado que adoro e a criança da nova era;

A Marly Schroder, por suas palavras e energias de luz;

A Luiz Carlos Ferreira Borges, por sua presença constante na fé;

A Eliza de Brito Neves, por cumprir a missão com a chama dourada;

Aos mestres que dedicaram seu tempo e sua paciência;

A Helder Luna, orientador que abraço com sentimento de gratidão;

A Ruy Alberto Caetano Corrêa Filho, pelos ajustes que edificaram;

A Maria das Graças Moraes, por sua crença e perseverança como educadora;

A Marilete Otaño, pela gentileza , paciência e boa vontade;

A Honorato Siqueira Campos, por providenciar os meios ajudando a prosseguir na jornada;

A Ana Paula Felício, pela amizade e presença em minha conquista.

LISTA DE TABELAS

“Página”

Tabela 1 -Coeficientes de correlação de Spearman (r_s) e os respectivos Valores-P do teste de significância do parâmetro (H_0 : parâmetro=0), entre a variável Relação Gonadossomática (RGS) e as variáveis: Número de Células com Micronúcleos (MN), Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA) e Número de Células com alguma das Alterações Anteriores (SOMA), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados no rio Aquidauana mensalmente durante o ano de 2004 em ambos os sexos.....

19

Tabela 2 -Coeficientes de correlação de Spearman (r_s) e os respectivos Valores-P do teste de significância do parâmetro (H_0 : parâmetro=0) entre a variável Relação Gonadossomática (RGS) e as variáveis: Número de Células com Micronúcleos (MN), Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA) e Número de Células com alguma das Alterações Anteriores (SOMA), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados no rio Aquidauana mensalmente durante o ano de 2004 para machos em ambas as classes.....

19

Tabela 3 -Coeficientes de correlação de Spearman (r_s) e os respectivos Valores-P do teste de significância do parâmetro (H_0 : parâmetro=0) entre a variável Relação Gonadossomática (RGS) e as variáveis: Número de Células com Micronúcleos (MN), Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA) e Número de Células com alguma das Alterações Anteriores (SOMA), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados no rio Aquidauana mensalmente durante o ano de 2004 para fêmeas em ambas as classes.....

20

1 - Introdução

1.1 - Micronúcleos em Peixes

Os peixes podem atuar como organismos sentinelas indicando o grau de exposição aos genotóxicos e são reconhecidos como os maiores vetores na transferência de contaminação aos humanos. Os organismos aquáticos são apropriados para o biomonitoramento de investigações *in situ* de poluentes por possuírem representantes em diferentes níveis na cadeia trófica e podem responder a substâncias mutagênicas em baixas concentrações. O micronúcleo é um núcleo supranumerário visível por microscopia óptica no citoplasma de uma célula; e a análise da sua frequência é conhecida como teste de micronúcleos e tem sido empregado em laboratório como ensaio de genotoxicidade de compostos químicos presentes na água.

Os micronúcleos foram inicialmente descritos em células vermelhas do sangue por HOWEL (1891) e mais tarde por JOLLY (1905) citados por BRUNETTI et al., (1988). São corpúsculos contendo DNA que podem estar presentes próximos aos núcleos das células durante a interfase (BRUNETTI et al., 1988). Os micronúcleos representam cromossomos acêntricos, fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros perdidos durante a anáfase celular e são facilmente visualizados em eritrócitos (HUGHES e HEBERT, 1991; PALHARES e GRISOLIA, 2002). Os fragmentos cromossomais atrasam-se quando os fragmentos centrais movimentam-se para os pólos do fuso e também são incluídos nas células filhas, mas uma considerável proporção é transferida para o interior de um ou vários núcleos secundários que são em critério menores do que o núcleo principal e por esta razão são chamados de micronúcleos; e em poucas horas após o término da última mitose os eritrócitos expulsam os seus núcleos, e por razões desconhecidas os micronúcleos continuam no citoplasma dos eritrócitos (SCHMID, 1975).

Os micronúcleos apresentam diâmetro de 1/20 a 1/10 dos núcleos dos eritrócitos e raramente aproximam-se de 1/3 do núcleo de origem, e os critérios na contagem dos micronúcleos são as ausências de conexões com o núcleo principal (HOSE et al., 1984; RUSSO et al., 2003) e a coloração igual ou mais clara do que o núcleo sem refratibilidade (STRUNJAK et al., 2003). Embora micronúcleos possam surgir espontaneamente, a indução de micronúcleos é comumente utilizada para detectar os prejuízos citogenéticos resultantes da exposição a agentes carcinogênicos (HOSE et al., 1987).

A conexão quantitativa entre a frequência de fragmentos acêntricos e de aberrações cromossomais não é bem conhecida, porque não são todos os fragmentos acêntricos que vem a ser micronúcleos; e presumivelmente varia de um tipo celular para outro assim como o tamanho e as formas dos cromossomos (HEDDLE et al., 1991). Alterações cromossomais são mais evidentes após sete dias da exposição a agentes mutagênicos e não há um incremento após quinze a trinta dias, o que é típico de marcadores biológicos porque as células danificadas tendem a ser removidas do organismo mais rapidamente do que as células mais jovens (DE FLORA et al., 1996).

As frequências de micronúcleos nos eritrócitos são altamente dependentes do ciclo hematopoiético e da farmacocinética das drogas (AL-SABTI e METCALFE, 1995; PALHARES e GRISÓLIA, 2002). Devido à cinética celular sanguínea os eritrócitos estão em continua reposição e o período de vida dos eritrócitos, em várias espécies de peixes, excede o limite de oitenta a quinhentos dias, com a maturação eritrocitária de dezessete a vinte e três dias (FISCHER et al., 1994).

Os xenobióticos atuam por um longo tempo em locais de amostragem poluídos e comumente causam a morte de células pré-mitóticas e a redução da progressão celular, pois os prejuízos citogenéticos não são manifestados (BRUNETTI et al., 1988).

O teste de micronúcleos não é dependente de qualquer característica cariotípica e pode ser aplicado para diversas espécies de peixes (HOSE et al., 1987; HUGHES e HEBERT, 1991). Em peixes o teste de micronúcleos é geralmente baseado em eritrócitos periféricos, mas os rins e os tecidos branquiais também são utilizados e uma maior quantidade de eritrócitos micronucleados pode ser encontrada nos rins do que nas brânquias; todavia para o biomonitoramento, a análise de micronúcleos é mais vantajosa via eritrócitos periféricos que são mais sensíveis e fáceis de coletar do que os eritrócitos renais (PALHARES e GRISOLIA, 2002). Todavia, a maior vantagem do uso de células periféricas sanguíneas (eritrócitos ou linfócitos) é evitar o sacrifício animal, permitindo desta forma que sejam efetuados monitoramentos sucessivos das mesmas populações (LLORENTE et al., 2002).

A formação de micronúcleos também pode ser mensurada em larvas de peixes por preparação de lâminas de massa de fígado, que é o órgão hematopoiético durante o estágio larval (HOSE et al., 1987).

A cloração da água tem originado a formação de compostos mutagênicos/carcinogênicos tais como haloalcenos, ácido haloacético, haloacetonas e haloaldeídos resultantes de reação do cloro com compostos orgânicos (ácidos húmico e fúlvico) presentes em águas naturais; e nas espécies mantidas em laboratório em água declorinada, observou-se um decréscimo na frequência de micronúcleos quando comparadas às examinadas imediatamente após a captura proveniente de águas poluídas (RUSSO et al., 2004). Este resultado evidencia a presença de mecanismos moleculares efetivos de reparação determinando um decréscimo no DNA prejudicado nas espécies após a remoção de um ambiente com a presença de genotóxicos; e reforça a hipótese de que o teste de micronúcleos deve ser conveniente somente para a detecção a curto prazo de prejuízos cromossomais (MINISSI et al., 1996; RUSSO et al., 2004).

Substâncias químicas diversas estão sendo testadas segundo o seu potencial de genotoxicidade, principalmente aqueles agentes que possam ser uma ameaça ao meio ambiente colocando em risco a saúde de animais e seres humanos. Com peixes, o Teste de Micronúcleos revelou-se como um excelente marcador biológico, utilizando agentes químicos que levaram a formação de micronúcleos, citam-se como exemplo, etilmetanosulfonato ou benzopireno (HOOFTMAN, 1981; HOSE et al., 1984), aflatoxina B1, benzidina (AL-SABTI, 1986), mercúrio (BABICH et al., 1990; AL-SABTI, 1994), o cromo (AL-SABTI et al., 1995), lambdacialotrim (CAMPANA et al., 1999), pentaclorofenol (REPETTO et al., 2001), ácido diclorofenoxiacético e butacloro (ATEEQ et al., 2002), ciclofosfamida e mitomicina C (PALHARES e GRISOLIA, 2002) entre outros elementos.

Além de fatores químicos, alterações físicas como a temperatura também pode induzir a formação de micronúcleos (AL-SABTI e METCALFE, 1995). O choque térmico quando aplicado em ovos de peixes após a fertilização normal, previne a extrusão em blocos do segundo cromossomo polar resultando na incorporação de um terceiro cromossomo inserido para o interior do genoma; além da indução de poliploidia produz efeitos genotóxicos que podem resultar na ocorrência tardia de micronúcleos, pois as células triplóides podem conter múltiplos alvos moleculares para danos genéticos durante a divisão celular em comparação com as diplóides (STRUNJAK-PEROVIC et al., 2003).

Apesar do fato de que a correlação entre anomalias nucleares e efeitos genotóxicos não tenha sido standardizada, existem observações preliminares altamente sugestivas de que cada alteração morfológica possa ser uma manifestação dos efeitos de xenobióticos (FERRARO et al., 2004).

As morfologias anormais de eritrócitos são estabelecidas para superarem o estresse induzido por químicos e incluem esferócitos, projeções lobopodiais, acantócitos, eritrócitos enucleados, vacúolos, equinócitos e anisocromasia (ATEEQ et al., 2002).

A elevada frequência de micronúcleos em amostras congeladas de sangue pode ser devido ao aparecimento de fragmentos, provavelmente como uma consequência de eritrócitos e leucócitos não separados nas amostras e que podem sofrer lises durante o processo de congelamento, decrescendo em número e produzindo artefatos, interferindo nos resultados (FISCHER et al., 1994).

Na avaliação dos efeitos da poluição na biota é de extrema importância conhecer os impactos possíveis de substâncias bioacumulativas na capacidade reprodutiva dos organismos em questão. LONGWELL et al., (1983) citado por HUGHES e HEBERT (1991) verificaram que o número de micronúcleos do linguado do sul da Islândia teve um incremento com o seu período de reprodução no final da desembocadura do rio devido a migrações perto da costa e para o interior de áreas muito contaminadas e que isto também pode estar associado com a maturação gonadal. Os machos de linguado em reprodução são os mais afetados por contaminantes circundantes do que os linguados sexualmente imaturos desde que estejam expostos aos compostos genotóxicos por longos períodos na preparação para a reprodução (HUGHES e HEBERT, 1991).

Acredita-se que a exposição aos xenobióticos tenha um efeito detrimental no desenvolvimento ovariano e na reprodução dos peixes teleósteos; e entre os efeitos observa-se a inibição do desenvolvimento ovariano, incremento da atresia folicular tanto do saco vitelino como de ovócitos pré-vitelogênicos, a deposição anormal da gema e a produção e maturação anormal do ovo; as fêmeas analisadas em áreas altamente contaminadas apresentaram anormalidades reprodutivas significativas por ocorrer recrudescência gonadal e terem médias reduzidas nos níveis de estradiol plasmático do que as fêmeas de locais menos contaminados (JOHNSON et al., 1988).

Experimentos com reprodução induzida demonstraram que a frequência maternal de micronúcleos em *White croaker* permite prever o sucesso reprodutivo, pois em peixes com contagem elevada de micronúcleos, os ovos apresentaram baixas taxas de fertilização (HOSE et al., 1987).

Com relação ao metabolismo endógeno, foi postulado que nas fêmeas de linguado com gônadas maduras, o fígado produz precursores gonadais de proteínas que liberam metabólitos tóxicos e estas toxinas poderiam elevar a taxa de micronúcleos (HUGHES e HEBERT, 1991).

1.2 - Relação Gonadossomática

Em função da estreita relação entre o avanço do processo de maturação ovocitária e o aumento do volume e, conseqüentemente do peso dos ovários; a relação gonadossomática (RGS) que expressa a proporção que as gônadas representam do peso total (Wt) ou do peso corporal dos indivíduos, mostra-se como um indicador eficaz do estado funcional dos ovários, além da proporção dos diferentes estádios gonadais, fornecendo indicações sobre as épocas de desova dos peixes (VAZZOLER, 1996). A relação gonadossomática tem sido considerada por alguns autores como o melhor indicador da época de reprodução dos peixes pelo fato de que a maturação de células germinativas ocorre concomitantemente ao aumento do peso das gônadas (BARBIERI et al., 1982, BAZZOLI e GODINHO, 1991; VAZZOLER, 1996).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a existência de associação da relação gonadossomática com a frequência de micronúcleos e de núcleos morfológicamente alterados em eritrócitos de *Piaractus mesopotamicus* no rio Aquidauana, MS.

REFERÊNCIAS

AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic mutagenic chemicals. **Cytobios**, v. 47, n.191, p. 147-154, 1986.

AL-SABTI, K. Micronulei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. **Mutation Research**, v. 320, n. 1-2, p. 157-163, 1994.

AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANIC, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium-induced micronuclei in fish. **Journal Applicable Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 333-336, 1995.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, n.2-3, p. 121-135, 1995.

ATEEQ, B.; ABUL, FARAH, M.; NIAMAT, A, M.; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, v. 518, n. 2, p.135-144, 2002.

BABICH, H.; GOLDSTEIN, S.H.; BORENFREUND, E. In vitro cyto and genotoxicity of organomercurials to cells in culture. **Toxicology Letters**, v.50, n.2-3, p.143-149, 1990.

BARBIERI, G.; SANTOS, M. V. R.; SANTOS, J.M. Época de reprodução e relação peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 17, n. 7, p. 1.057-1.067, 1982.

BAZZOLI, N.; GODINHO, H. P. Reproductive biology of the dog fish *Acestrorhinus lacustris* (Reinhardt, 1874) (Pisces, Characidae) from a tropical Brazilian reservoir. **Zoologischer Anzeiger- A Journal of Comparative Zoology**, v. 226, n. 5/6, p. 285-297, 1991.

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLA, I.; BELTRAME, C. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. **Marine Ecology – Progress Series**, v. 44, p. 65-68, 1988.

BUSCHINI, A.; MARTINO, A.; GUSTAVINO, B.; MONFRINOTTI, M.; POLI, P.; ROSSI, C.; SANTORO, M.; DORR, A.J.M.; RIZZONI, M. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. **Mutation Research**, v.557, p. 119-129, 2004.

CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J.; DULOOT, F.N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**, v. 438, p. 155-161, 1999.

DE FLORA, S.; VIGANO, L.; AGOSTINI, F. D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, v.319, p. 167-177, 1993.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. de O.; CESTARI, M.M. Tributyltin and inorganic lead (Pb II) mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *Hoplias malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronuclei and chromosome aberrations test. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n.1, 2004.

FISCHER, S. K.; DALLAS, C. E.; JAGOE, C.; SMITH, M. H.; BRISBIN, I. L.; CHESSER, R. K. Sources of error associated with sample collection and preparation of nucleated blood cells for flow cytometric analysis. **Cell Biology Toxicology**, v. 10, n.3, p. 145-153, 1994.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TYCKER, J. D.; VANPARYS, P.; MAC GREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, V. 18, P. 277-291, 1991.

HOOFTMAN, R.N. The induction of chromosome aberrations in *Notobranchius rachowi* (Pisces: Cyprinodontidae) after treatment with ethyl methanesulphonate or benzo(a)pyrene. **Mutation Research**, v. 91, p. 347-352, 1981.

HOSE, J. E.; HANNAH, J. B.; PUFFER, H. W.; LANDOLT, M. L. Histologic and skeletal abnormalities in benzo(a)pyrene- treated rainbow trout alevins. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 13, p. 675-694, 1984.

HOSE, J.E.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California. **Marine Environmental Research**, v. 22, p. 167-176, 1987.

HUGHES, J.B.; HEBERT, A.T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in long Island Sound. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, n.4, p.474-479, 1991.

JOHNSON, L. L.; CASILLAS, E.; COLLIER, T.K.; MCCAIN, B.B.; VARANASI, V. Contaminants effects on ovarian development in english sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. **Canadian Journal Fish Aquatic Science**, v.45, p. 2133-2144, 1988.

LLORENTE, M. T.; MARTOS, A.; CASTAÑO, A. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.11, n. 1, p. 27-34, 2002.

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.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C.K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25 (3), p. 281-284, 2002.

REPETTO, G.; JOS, A.; HAZEN, M.J.; MOLERO, M.L.; DEL PESO, A.; SALGUERO, M.; CASTILLO, P.D.; RODRIGUEZ-VICENTE, M.C.; REPETTO, M. A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. **Toxicology In Vitro**, v.15, n. 4-5, p.503-509, 2001.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M.A.; STINGO, V. Assessment of Environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety** , v. 57, p. 168-174, 2004.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, V. 31, P. 9-15, 1975.

STRUNJAK-PEROVIC, I.; COZ-RAKOVAC, R.; TOPIC-POPOVIC, N. Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Veterinary Medicine**, v. 48, p. 215-219, 2003.

VAZZOLER, A. E. A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá-PR, EDUEM/SBI/CNPQ/Nupelia, 1996. 169 p.

ASSOCIAÇÃO ENTRE O DESENVOLVIMENTO GONADAL COM A FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE NÚCLEOS MORFOLOGICAMENTE ALTERADOS EM ERITRÓCITOS DE PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) CAPTURADOS NO RIO AQUIDAUANA, MS, BRASIL

Éder Dittmar ¹, Helder Silva e Luna²

RESUMO: O presente trabalho objetivou avaliar a existência de associação entre o desenvolvimento gonadal com a frequência de micronúcleos e núcleos morfológicamente alterados em eritrócitos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*). As capturas ocorreram mensalmente no rio Aquidauana. Para cada peixe foi realizada a análise de 3000 eritrócitos para a pesquisa de micronúcleos e núcleos morfológicamente alterados, utilizando-se esfregaço sanguíneo corado com giemsa. Foram analisados 50 machos e 23 fêmeas. Os sexos foram analisados separadamente. O teste de correlação não mostrou nenhuma associação entre o desenvolvimento gonadal com a frequência de micronúcleos e núcleos morfológicamente alterados. Nas condições do presente experimento, concluiu-se que o desenvolvimento gonadal em pacus não interferiu no incremento de micronúcleos e núcleos morfológicamente alterados.

Palavras-chave: Eritrócitos, Peixes, Pantanal

¹ Médico Veterinário, Pós-graduando, UFMS, Campo Grande/MS,

e-mail: ederdittmar@yahoo.com.br

² Médico Veterinário, Dr., Professor Adjunto, UFMS – CBC – CPAQ, Aquidauana/MS,

e-mail: hluna@ceua.ufms.br

**ASSOCIATION OF GONAD DEVELOPMENT WITH THE FREQUENCY OF
MORPHOLOGICALLY ALTERED MICRONUCLEI AND NUCLEI IN PIARACTUS
MESOPOTAMICUS ERYTHROCYTES IN NATURAL ENVIRONMENT.**

ABSTRACT: The present study aimed to evaluate the association of the gonad development with the frequency of morphologically altered nuclei and micronuclei in erythrocytes of *Piaractus mesopotamicus* (pacu). The capturing was conducted monthly in the Aquidauana river in 2004. After being collected, the fish immediately underwent blood collecting procedures and preparation of smears used in the study of micronuclei. After identification, the blades were fixed in methanol and transported to the laboratory. After that they were colored with giemsa and analyzed through optical microscope for research on micronuclei in the erythrocytes. For each fish specimen there was a count of 3000 erythrocytes for research on morphologically altered nuclei and micronuclei. 73 fish specimens were analyzed, 50 of which were male and 23 female. The sexes were analyzed separately. The study demonstrated that the gonad development has not interfered in the rate of morphologically altered nuclei and micronuclei.

Key words: Erythrocytes, Fish, Pantanal.

1 - INTRODUÇÃO

Os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos que não são incorporados no interior do núcleo filho (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros, que durante a segregação ocorrida na mitose, atrasam-se em relação aos demais na migração dos elementos centrais para os pólos da célula na anáfase (efeito aneugênico) (CAMPANA et al., 1999). Os micronúcleos são tipicamente arredondados, possuem cor e morfologia semelhantes ao núcleo principal que é nitidamente estruturado com limite bem definido facilitando a identificação de fragmentos em seu citoplasma (ATEEQ et al., 2002; LLORENTE et al., 2002). O teste de micronúcleos é uma promissora ferramenta para o biomonitoramento de efeitos clastogênicos em organismos aquáticos (DE FLORA et al., 1993).

HUGHES E HEBERT (1991) sugeriram existir correlação entre as fases reprodutivas e a ocorrência de micronúcleos com um provável aumento da incidência de micronúcleos em eritrócitos de *Pseudopleuronectes americanus* relacionado ao seu período de reprodução.

Os peixes são utilizados frequentemente como bioindicadores da qualidade das águas. Entre as diversas espécies de peixes de água doce que poderiam ser utilizadas, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) destaca-se por sua ampla distribuição abrangendo a bacia dos rios Prata e Paraguai na América do Sul (BORGHETTI e CANZI, 1993).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a associação entre o desenvolvimento gonadal com a frequência de micronúcleos e de núcleos morfológicamente alterados em eritrócitos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados no rio Aquidauana.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Local de Captura

O estudo foi realizado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no Campus de Aquidauana, MS e no Laboratório de Patologia Clínica em Campo Grande, MS. As capturas foram realizadas no rio Aquidauana, pertencente à bacia do Alto Paraguai. Foi estabelecido um ponto de captura no rio Aquidauana, localizado na Cachoeira do Camisão (20° 28' 58" S e 55° 38' 16" W).

Os exemplares de pacus foram capturados mensalmente, durante um período de 12 meses. As amostras foram coletadas com uma rede de lance e após a captura dos peixes foram encaminhadas para o laboratório a campo, sendo anestesiados em solução de benzocaína a 5% e sacrificados. Foram analisados os seguintes parâmetros: Peso Total (Wt), em quilos; Peso das Gônadas (Wg), em gramas e o Sexo.

2.2 – Relação Gonadossomática (RGS)

Foi calculada segundo Vazzoler (1996):

$$RGS = Wg/Wt \times 100$$

Onde: Wg = peso das gônadas ; Wt = peso total

2.3 - Micronúcleos

Após a captura dos peixes, foi retirado o sangue por punção da veia dorso caudal e realizado o esfregaço convencional. Após a secagem, o material foi fixado em metanol por 15 minutos. Ao término de cada coleta as lâminas foram coradas com giemsa, diluído em água destilada na concentração final de 5%, durante 10 minutos. Na seqüência, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico Olympus CX 31 no aumento de 1000X. Em cada peixe foram analisados 3000 eritrócitos, e pesquisou-se a presença de micronúcleos (MN) e núcleos morfológicamente alterados (NMA). Os resultados dos testes de micronúcleos foram expressos como frequências em 1000 eritrócitos.

2.4 - Distribuição das Classes

O estudo da associação entre as variáveis foi feito dentro das classes de sexo e da relação gonassomática (RGS). As classes de relação gonassomática foram formadas de acordo com o seguinte critério: Machos: Uma classe foi composta por 24 machos com RGS acima de 0,6 (gônadas em estágios iniciais e finais de maturação) e outra classe foi composta por 26 machos com RGS abaixo de 0,6 (imaturos).

Fêmeas: Uma classe foi composta por 7 fêmeas com RGS acima de 7,0 (gônadas em estágios iniciais e finais de maturação) e outra classe foi composta por 16 fêmeas com RGS abaixo de 7,0 (imaturos).

2. 5 – Análise Estatística

Para estudar a associação entre a variável Relação Gonadosomática (RGS) e as variáveis: Número de Células com Micronúcleos (MN), Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA) e Número de Células com alguma das Alterações Anteriores (SOMA), foram calculados os Coeficientes de Correlação de Spearman (r_s) respectivos, cuja significância (H_0 : parâmetro=0) foi avaliada pelo teste de t ($P<0,05$) (ZAR, 1984). As análises foram feitas usando o procedimento CORR do programa SAS para Windows versão 4.1.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontram-se nas tabelas 1, 2 e 3. As análises estatísticas não mostraram nenhuma correlação significativa.

Tabela 1 - Coeficientes de Correlação de Spearman (r_s) junto com os respectivos Valores-P do teste de significância do parâmetro (H_0 : parâmetro=0) entre a variável Relação Gonadossomática (RGS) e as variáveis: Número de Células com Micronúcleos (MN), Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA) e Número de Células com alguma das Alterações Anteriores (SOMA) de ambos os sexos em pacus (*Piaractus mesopotamicus*).

Variáveis		Machos (n=50)	Fêmeas (n=23)
		RGS	RGS
MN	r_s	-0.05455	0.30848
	Valor-P ⁽¹⁾	0.7067	0.1521
NMA	r_s	-0.03813	0.06204
	Valor-P	0.7927	0.7786
SOMA	r_s	-0.06703	0.13036
	Valor-P	0.6437	0.5533

(1) Probabilidade de erro tipo I obtida no teste de t do parâmetro (H_0 : parâmetro=0), cuja estimativa está acima do respectivo valor (significativo para $P < 0,05$).

Tabela 2 - Coeficientes de Correlação de Spearman (r_s) junto com os respectivos Valores-P do teste de significância do parâmetro (H_0 : parâmetro=0) entre a variável Relação Gonadossomática (RGS) e as variáveis: Número de Células com Micronúcleos (MN), Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA) e Número de Células com alguma das Alterações Anteriores (SOMA), em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) machos em duas classes de Relação Gonadossomática.

Variáveis		Machos (n=26)	Machos (n=24)
		RGS < 0,6 ⁽²⁾	RGS ≥ 0,6
MN	r_s	0.07429	0.06471
	Valor-P ⁽¹⁾	0.7183	0.7639
NMA	r_s	0.01409	-0.02840
	Valor-P	0.9455	0.8952
SOMA	r_s	-0.00722	-0.04193
	Valor-P	0.9721	0.8458

(1) Probabilidade de erro tipo I obtida no teste de t do parâmetro (H_0 : parâmetro=0), cuja estimativa está acima do respectivo valor (significativo para $P<0,05$).

(2) RGS: pacus com relação gonadossomática abaixo e acima de 0,6%.

Tabela 3 - Coeficientes de Correlação de Spearman (r_s) junto com os respectivos Valores-P do teste de significância do parâmetro (H_0 : parâmetro=0), entre a variável Relação Gonadossomática (RGS) e as variáveis: Número de Células com Micronúcleos (MN), Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA) e Número de Células com alguma das Alterações Anteriores (SOMA), em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) fêmeas em duas classes de Relação Gonadossomática.

Variáveis		Fêmeas (n=16)	Fêmeas (n=7)
		RGS $\leq 7,0^{(2)}$	RGS $> 7,0$
MN	r_s	-0.27116	-0.25944
	Valor-P ⁽¹⁾	0.3097	0.5742
NMA	r_s	0.12713	-0.7207
	Valor-P	0.6389	0.8780
SOMA	r_s	0.13117	-0.27028
	Valor-P	0.6282	0.5577

(1) Probabilidade de erro tipo I obtida no teste de t do parâmetro (H_0 : parâmetro=0), cuja estimativa está acima do respectivo valor (significativo para $P<0,05$).

(2) RGS: pacus com relação gonadossomática abaixo e acima de 7,0%.

As taxas de micronúcleos iguais ou acima de 50 micronúcleos em 1000 eritrócitos são consideradas como indicativas da presença de agentes clastogênicos nos peixes (GRISÓLIA, 2002).

Na presente pesquisa observou-se números menores do que 2 em 1000; e isto indica que nos peixes estudados não houve influência da ação de xenobióticos. As baixas frequências de micronúcleos detectadas devem ser devido a menor ação antropogênica exercida no rio Aquidauana via efluentes de esgotos domésticos que não apresenta compostos químicos clastogênicos em concentrações que produzam efeitos citogenéticos nos organismos aquáticos; e em decorrência deste fato nos peixes analisados, não foi encontrada correlação entre a maturação gonadal e os micronúcleos ou núcleos morfológicamente alterados (Anexos 1, 2, 3, 4, 5, 6).

O pacu e o linguado possuem ovos não aderentes demersais, porém o pacu apresenta rápido crescimento, alta rusticidade, onívoro, reofílico e pode ter menores impactos em sua fisiologia via contaminantes depositados em sedimentos no percurso do rio. A análise dos cariótipos de pacus apresenta $2n=54$ sendo formado por 20 metacêntricos e 34 submetacêntricos e indica que a espécie é apropriada para a avaliação de efeitos clastogênicos em programas de monitoramento genético. LONGWELL et al. (1983) citados por HUGHES e HEBERT (1991) sugerem que no linguado americano há um incremento do número de micronúcleos correlacionado com o período de reprodução sendo que este peixe apresenta hábitos costeiros

O fígado produz precursores gonadais de proteínas que liberam metabólitos potencialmente tóxicos que poderiam elevar a taxa de micronúcleos (HUGHES e HEBERT, 1991). Entretanto, nos peixes capturados provavelmente não ocorreu influência de metabólitos endógenos tóxicos na taxa de micronúcleos produzidos durante os estádios de maturação gonadal.

Quanto aos núcleos morfológicamente alterados, os mesmos são considerados indicadores da presença de agentes genotóxicos. No presente trabalho as variações consistentes da forma elíptica do núcleo e os núcleos vacuolados com um orifício bem definido destituído

de material visível que parece ser demarcado por uma membrana; similarmente aos micronúcleos não foi encontrada correlação com a maturação gonadal.

4 - CONCLUSÕES

O estudo permitiu constatar que nas condições deste experimento não houve associação entre o desenvolvimento gonadal e a frequência de micronúcleos e de núcleos morfológicamente alterados em eritrócitos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados no rio Aquidauana.

5 - REFERÊNCIAS

ATEEQ, B.; ABUL, FARAH, M.; NIAMAT, A, M.; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, v. 518, n. 2, p.135-144, 2002.

BORGHETTI, J. R.; CANZI, C. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in ages. **Aquaculture**, Amsterdam, v.114, p.93-101, 1993.

CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J.; DULOOT, F.N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**, v. 438, p. 155-161, 1999.

DE FLORA, S.; VIGANO, L.; AGOSTINI, F. D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, v.319, p. 167-177, 1993.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v. 518, n. 2, p.145-150, 2002.

HUGHES, J.B.; HEBERT, A.T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in long Island Sound. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, n. 4, p. 474-479, 1991.

JOHNSON, L. L.; CASILLAS, E.; COLLIER, T.K.; MCCAIN, B.B.; VARANASI, V. Contaminants effects on ovarian development in english sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. **Canadian Journal Fish Aquatic Science**, v.45, p. 2133-2144, 1988.

LLORENTE, M.T.; MARTOS, A.; CASTANO, A. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.11, n. 1, p. 27-34, 2002.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evolution of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 442-448 , 2003.

SAS INSTITUTE User`s guide: statistical analysis system. 5ed. Cary, NC: **SAS Institute** Inc.1996. 956p.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1984. 718 p.

ANEXOS

Anexo 01 – Distribuições de frequência em peixes machos para a variável Número de Células com Micronúcleos (MN, em 3000) de acordo com a classe de relação gonadossomática (CLRGS), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados mensalmente no rio Aquidauana durante o ano de 2004.

MN	CLRGS1 ⁽¹⁾		CLRGS2		Total	
	Frequênci	Percentage	Frequênci	Percentage	Frequênci	Percentage
	a	m	a	m	a	m
0	17	65,38	18	75,00	35	70,00
1	4	15,38	2	8,33	6	12,00
2	2	7,69	3	12,50	5	10,00
3	2	7,69			2	4,00
4			1	4,17	1	2,00
5	1	3,85			1	2,00
Total	26	100	24	100	50	100
l						

(1) – CLRGS1 – classe composta por 26 machos com RGS abaixo de 0,6 (imaturos)

(2) –CLRGS 2 – classe composta por 24 machos com RGS acima de 0,6

(gônadas em estádios mais avançados)

Anexo 02 – Distribuições de frequência em peixes fêmeas para a variável Número de Células com Micronúcleos (MN, em 3000) de acordo com a classe de relação gonadossomática (CLRGS), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados mensalmente no rio Aquidauana durante o ano de 2004.

MN	CLRGS1 ⁽¹⁾		CLRGS ²		Total	
	Frequênci	Percentage	Frequênci	Percentage	Frequênci	Percentage
	a	m	a	m	a	m
0	11	68,75	1	14,29	12	52,17
1	4	25,00	3	42,86	7	30,43
2	1	6,25	1	14,29	2	8,70
3			1	14,29	1	4,35
4	0	0,00	0	0,00	0	0,00
5			1	14,29	1	4,35
Total	16	100	7	100	23	100
l						

(1) – CLRGS1 – classe composta por 16 fêmeas com RGS abaixo de 7,0 (imaturas)

(2) – CLRGS2 – classe composta por 7 fêmeas com RGS acima de 7,0

(gônadas em estádios mais avançados)

Anexo 03 – Distribuições de frequência em peixes machos para a variável Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA, em 3000) de acordo com a classe de relação gonadossomática (CLRGS), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados mensalmente no rio Aquidauana durante o ano de 2004.

NM A	CLRGS1 ⁽¹⁾		CLRGS ²		Total	
	Frequênci a	Percentage m	Frequênci a	Percentage m	Frequênci a	Percentage m
0	1	3,85	2	8,33	3	6,00
1			1	4,17	1	2,00
2	2	7,69	4	16,67	6	12,00
3	3	11,54	1	4,17	4	8,00
4	3	11,54			3	6,00
5	2	7,69	2	8,33	4	8,00
6	5	19,23	2	8,33	7	14,00
7						
8	1	3,85	3	12,50	4	8,00
10	2	7,69	1	4,17	3	6,00
11			1	4,17	1	2,00
12	2	7,69	3	12,50	5	10,00
13			2	8,33	2	4,00
14	1	3,85	1	4,17	2	4,00
15	1	3,85			1	2,00
18						
20	1	3,85	1	4,17	2	4,00
21						
22	1	3,85			1	2,00
25	1	3,85			1	2,00
26						
Total	26	100	24	100	50	100

(1) – CLRGS 1- classe composta por 26 machos com RGS abaixo de 0,6 (imaturos)

(2) – CLRGS 2- classe composta por 24 machos com RGS acima de 0,6
(gônadas em estádios mais avançados)

Anexo 04 – Distribuições de frequência em peixes fêmeas para a variável Número de Células com Núcleos Morfologicamente Alterados (NMA, em 3000) de acordo com a classe de relação gonadossomática (CLRGS), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados mensalmente no rio Aquidauana durante o ano de 2004.

NM A	CLRGS1 ⁽¹⁾		CLRGS ²		Total	
	Frequênci a	Percentage m	Frequênci a	Percentage m	Frequênci a	Percentage m
0	1	6,25	1	14,29	2	8,70
1						
2						
3	2	12,50			2	8,70
4	3	18,75			3	13,04
5	1	6,25	1	14,29	2	8,70
6						
7	2	12,50			2	8,70
8			1	14,29	1	4,35
10			1	14,29	1	4,35
11						
12	2	12,50	2	28,57	4	17,39
13			1	14,29	1	4,35
14	1	6,25			1	4,35
15	1	6,25			1	4,35
18	1	6,25			1	4,35
20						
21	1	6,25			1	4,35
22						
25						
26	1	6,25			1	4,35
Total	16	100	7	100	23	100

(1) – CLRGS1 – classe composta por 16 fêmeas com RGS abaixo de 7,0 (imaturas)

(2) – CLRGS 2- classe composta por 7 fêmeas com RGS acima de 7,0
(gônadas em estádios mais avançados)

Anexo 05 – Distribuições de frequência em peixes machos para a variável Número de Células com Micronúcleos ou Núcleos Morfologicamente Alterados (SOMA, em 3000) de acordo com a classe de relação gonadossomática (CLRGS), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados mensalmente no rio Aquidauana durante o ano de 2004.

SOM A	CLRGS1 ⁽¹⁾		CLRGS2		Total	
	Frequênci a	Percentage m	Frequênci a	Percentage m	Frequênci a	Percentage m
0	1	3,85	2	8,33	3	6,00
1			1	4,17	1	2,00
2	2	7,69	4	16,67	6	12,00
3	3	11,54	1	4,17	4	8,00
4	1	3,85			1	2,00
5	3	11,54	1	4,17	4	8,00
6	5	19,23	3	12,50	8	16,00
7						
8			3	12,50	3	6,00
9						
10	2	7,69			2	4,00
11			1	4,17	1	2,00
12	1	3,85	2	8,33	3	6,00
13	3	11,54	2	8,33	5	10,00
14	1	3,85	1	4,17	2	4,00
15	1	3,85	1	4,17	2	4,00
16			1	4,17	1	2,00
17						
18						
22	1	3,85	1	4,17	2	4,00
23	1	3,85			1	2,00
25	1	3,85			1	2,00
26						
Total	26	100	24	100	50	100

(1) –CLRGS 1 – classe composta por 26 machos com RGS abaixo de 0,6 (imaturos)

(2)- CLRGS 2- classe composta por 24 machos com RGS acima de 0,6 (gônadas em estádios mais avançados)

Anexo 06 – Distribuições de frequência em peixes fêmeas para a variável Número de Células com Micronúcleos ou Núcleos Morfologicamente Alterados (SOMA, em 3000) de acordo com a classe de relação gonadossomática (CLRGS), em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados mensalmente no rio Aquidauana durante o ano de 2004.

SOM A	CLRGS1 ⁽¹⁾		CLRGS2		Total	
	Frequênci a	Percentage m	Frequênci a	Percentage m	Frequênci a	Percentage m
0	1	6,25			1	4,35
1			1	14,29	1	4,35
2						
3	2	12,50			2	8,70
4	2	12,50			2	8,70
5	1	6,25			1	4,35
6	1	6,25			1	4,35
7	1	6,25			1	4,35
8	1	6,25			1	4,35
9			1	14,29	1	4,35
10			1	14,29	1	4,35
11						
12	2	12,50	2	28,57	4	17,39
13						
14	1	6,25	1	14,29	2	8,70
15			1	14,29	1	4,35
16						
17	1	6,25			1	4,35
18	1	6,25			1	4,35
22	1	6,25			1	4,35
23						
25						
26	1	6,25			1	4,35
Total	16	100	7	100	23	100

(1) – CLRGS1 – classe composta por 16 fêmeas com RGS abaixo de 7,0 (imaturas)

(2)- CLRGS 2- classe composta por 7 fêmeas com RGS acima de 7,0
(gônadas em estádios mais avançados)

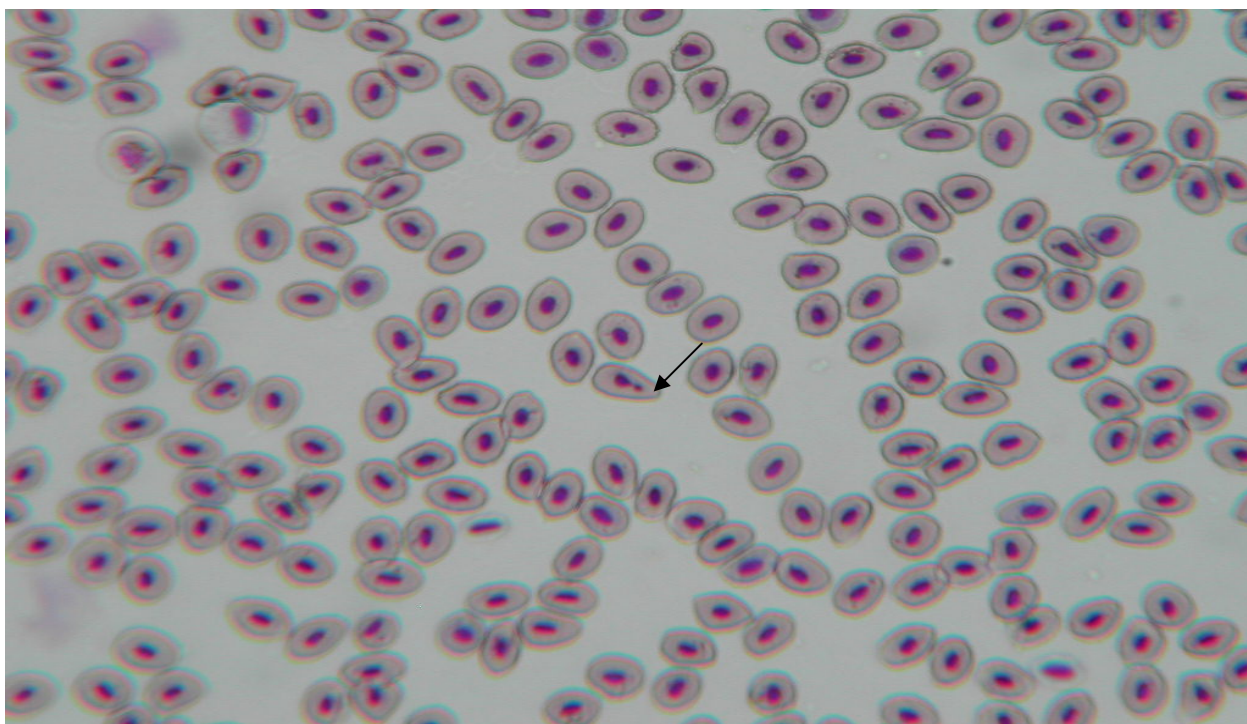


Figura 1. Eritrócitos de *Piaractus mesopotamicus*. Seta indica micronúcleo(400X).

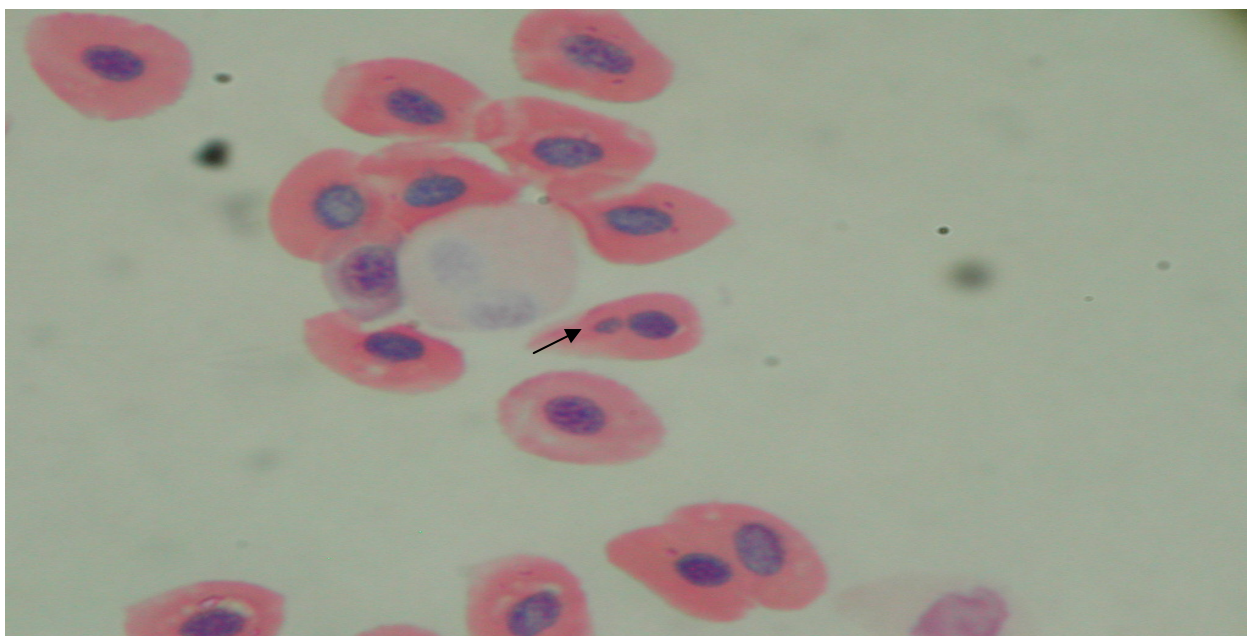


Figura 2. Eritrócitos de *Piaractus mesopotamicus*. Seta indica micronúcleo(1000X).

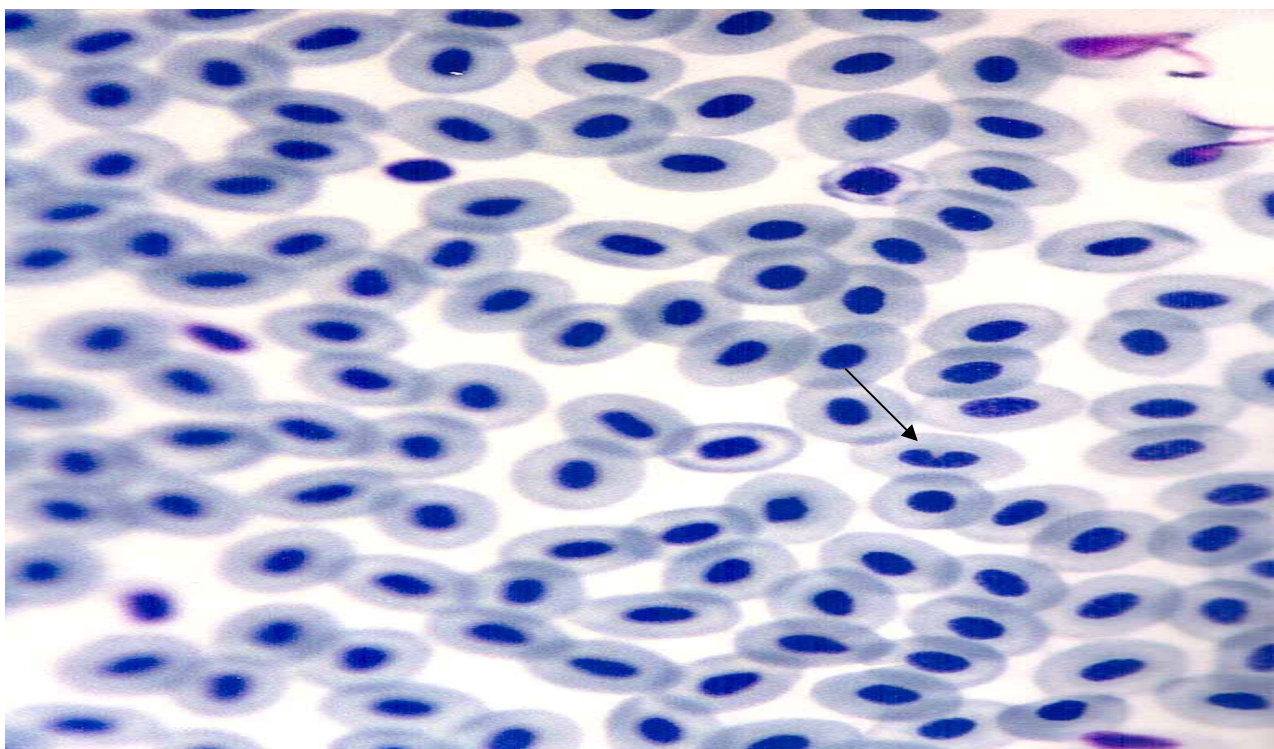


Figura 3. Eritrócitos de *Piaractus mesopotamicus*. Seta indica núcleo morfológicamente alterado (1000x).

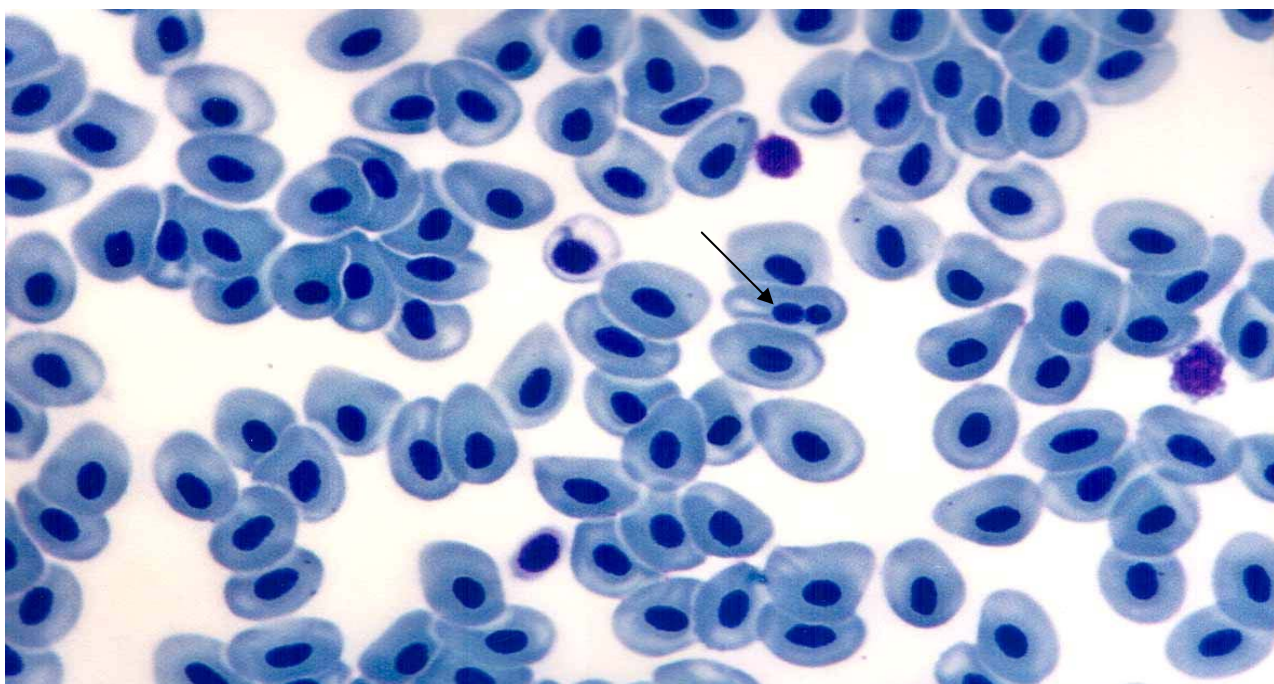


Figura 4. Eritrócitos de *Piaractus mesopotamicus*. Seta indica micronúcleo (1000x)

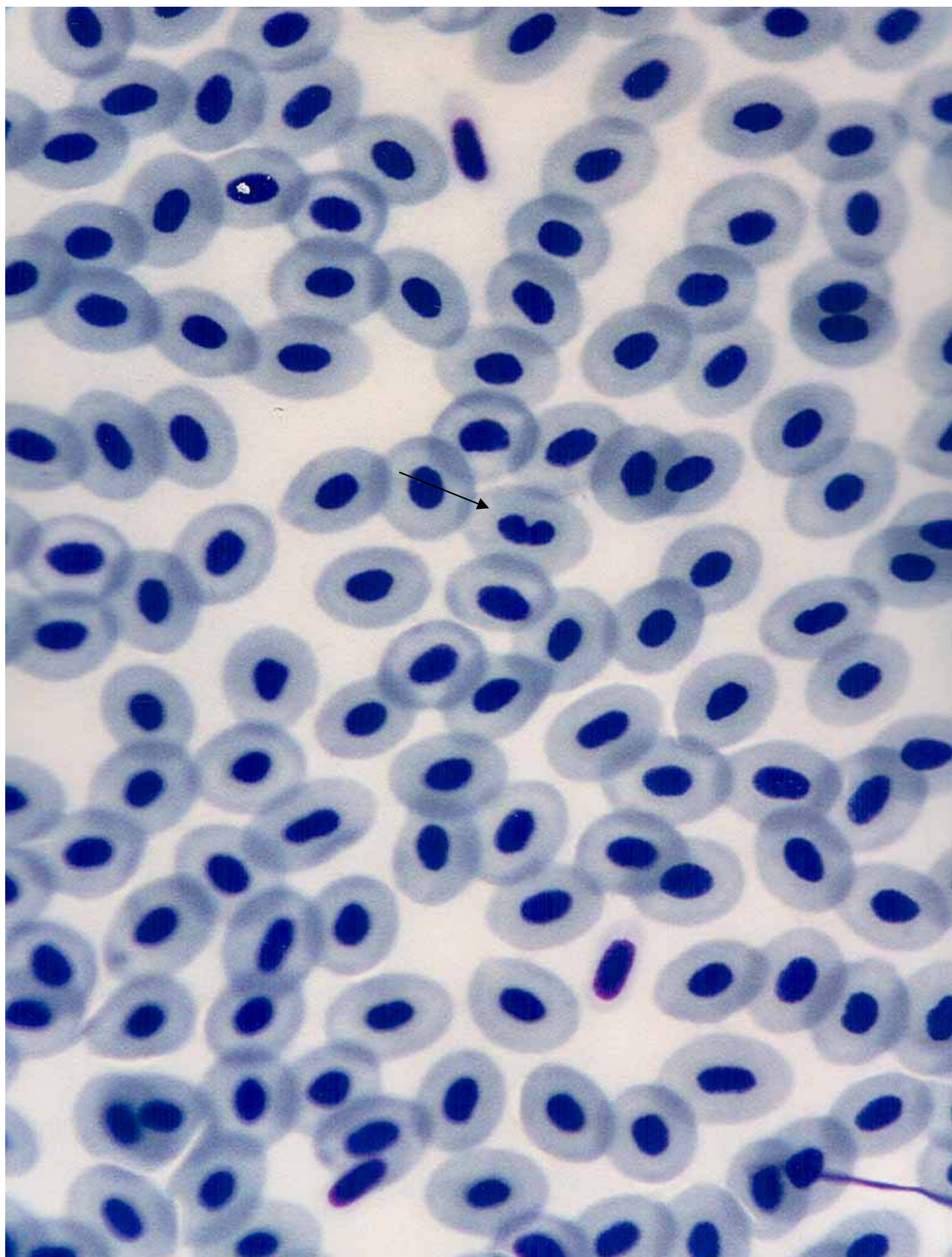


Figura 5 - Eritrócitos de *Piaractus mesopotamicus*. Seta indica núcleo morfológicamente alterado (1000x).