

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Anderson de Carvalho Fonseca

**Contagem Diferencial da Série Branca e Frequência de Micronúcleos em Eritrócitos
de Peixe Characidae, *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), Sob Condições de
Cativeiro**

Dourados

2010

Anderson de Carvalho Fonseca

Contagem Diferencial da Série Branca e Frequência de Micronúcleos em Eritrócitos de Peixe Characidae, *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), Sob Condições de Cativeiro

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como exigência parcial para conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Aparecido Grassi.

Dourados

2010

Anderson de Carvalho Fonseca

**CONTAGEM DIFERENCIAL DA SÉRIE BRANCA E FREQUÊNCIA DE
MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE PEIXE CHARACIDAE, ASTYANAX
BIMACULATUS (LINNAEUS, 1758), SOB CONDIÇÕES DE CATIVEIRO**

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Grande
Dourados, pela comissão formada por:**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Aparecido Grassi
UEMS

Co-orientadora: Profa. Dra. Filomena Maria Perrella Balestieri
FCBA – UFGD

Prof. Dr. Jairo Campos Gaona
FCA – UFGD

Dourados, 15 de dezembro de 2010.

Aos animais sacrificados nesta pesquisa.

**Aos cidadãos que pagam seus impostos
e, portanto, financiaram minha
graduação.**

**Aos meus pais, Assenção e Nivaldo,
e meu irmão Rafael, pelo carinho,
amor e exemplos,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

Aos animais, os que foram ou não sacrificados nesta pesquisa, que suas vidas sejam enfaticamente valorizadas em qualquer decisão sobre produção de ciência, que as metodologias sejam repensadas no intuito de minimizar tamanhas perdas.

A todos os cidadãos de boa índole, que contribuíram e vem contribuindo com as instâncias governamentais e, desta forma, financiaram os meus estudos durante a minha permanência no ensino público;

A matriarca da minha família, a Sra. Josefa Assenção de Carvalho Fonseca, que na incomensurável perda de meu pai soube lidar com admirável grandeza, frente às situações limitantes e os encargos de uma líder familiar, sempre solícita, amável e carinhosa com seus filhos;

Ao meu mais que amado pai, Sr. Nivaldo Alves Fonseca, um homem que junto a minha mãe, forneceu tenros princípios e que cuja pauta era a dignidade, a honestidade, a fraternidade e a determinação;

Ao meu irmão e amigo, Rafael Carvalho Fonseca, uma pessoa de caráter e admiração peculiar, um exemplo de fraternidade, carisma e sociabilidade que em muito me educou com seus atos, que sempre fez questão de tomar parte de minhas dificuldades, mesmo quando se era impossível de assumi-las em conjunto. Um trabalhador equiparável cujo trabalho, ao lado do empenho de minha mãe, também propiciou a minha permanência em um curso de graduação. Um ser humano tão grande quanto imagina;

As minhas irmãs e amigas Renata de Carvalho Fonseca e Rita de Cássia de Carvalho Fonseca, pela força e incentivo aos estudos. Ao meu amigo e cunhado Christian Eberhardt e as minhas sobrinhas, Cíntia Caballero Fonseca e Priscila Caballero Fonseca, pelas palavras positivas e pela crença das vitórias;

Aos meus colegas de graduação e agora imaculáveis e grandes amigos, Flavio Gato Cucolo e Thiago Augusto de Paula Pepe, pela colaboração com a minha vida, com a minha graduação e com a minha família, de diversas e incontáveis maneiras. Pelos longos períodos de diálogos filosóficos, de troca e agregações das boas ideologias, da construção simultânea do conhecimento científico, de vida e sociedade;

Aos meus eternos amigos, Gabriel Fávero Massocato, Thales Aquino Barros, Maycon Ávalos e Guilherme Guastaldi Dosualdo, pelo companheirismo, apoio, amizade e ensinamentos;

A República Thuckulú, República Coqueiro e Recanto Shangri-la pelos momentos ímpares que tive a oportunidade de viver durante a minha graduação, pelas histórias que tenho pra contar e pela significado que me representa;

A minha cadelinha Fada, que já se foi, por ser a minha “companherinha fiel” nas noites de estudo, por me ouvir nos momentos de aflição e por me recepcionar alegremente nos dias difíceis da faculdade;

Aos meus permanentes amigos de faculdade e convivência, Bruno Campos, Valmor Alovisi, Dhemes Fliver de Ramos e André “morcego”, pelas palavras de apoio e pelas agradáveis conversas;

Ao amigo advogado Fernando “ceará”, pela ajuda que me ofereceu no início da minha graduação e pelo incentivo;

As minhas amigas Camila Candil, Kefany Ramalho e Graziela Martins pelo apoio que sempre me deram e pelas amigas que foram durante a minha graduação;

Ao meu amigo e professor, José Daniel de Freitas Filho, pelos exemplos que me dera e pela valorosa amizade;

A minha amiga poetiza e co-orientadora, Profa. Filomena Maria Perrella Balestieri, pelo apoio e ensinamentos, pela dedicação e respeito com a sua profissão e seus alunos, pela qualidade de docência e pela sensibilidade humana, algo que a ciência e o egoísmo profissional estão marginalizando;

A minha amiga e professora Ângela Canesin, pela fraternidade e preocupação com a vida pessoal de seus alunos, por não encará-los como um item de sua profissão e pelos esforços e inferências a favor destes;

Aos professores Valter Alves Junior, José Benedito Perrella Balestieri e Jairo Campos Gaona pelos inúmeros projetos de ensino que se desprendem a realizar no intuito de complementar a nossa formação;

A professora e amiga Liane Maria Calarge, que como poucos, travou batalhas e esforços na busca por um aparato digno ao ensino e ao curso que ela faz parte;

Ao Sr. João Figueiredo, “ Tio Figa ”, um amigo que muito me motivou a escrever um caminho profícuo de vida, um companheiro que me acolhera, desde de criança, nos momentos de rebeldia, aflição e erros, que em todo o instante soube oferecer respostas a ansiedade típica de qualquer adolescente, e desta forma, assumiu o papel do pai que eu perdi. Uma pessoa simples, mesmo dotando da boa formação acadêmica que o mundo hoje nos inculca, me ofertou muito da moralidade e humildemente que hoje carrego comigo;

Ao Sr. Antonio Franco da Rocha Junior, pelos investimentos na minha formação e pelos incentivos morais que me dedicou, desde a infância até o momento;

Ao Sr. Geraldo Bonelli, por acreditar na minha prosperidade enquanto estudante, por investir na minha formação e por ser o amigo que hoje é;

Ao Sr. José Carlos, secretário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, pela ótima pessoa que tem sido a nós estudantes, pela atenção e respeito com que nos trata e pela boa amizade;

Aos meus amigos do Laboratório de Ecofisiologia da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Fernando Alves de Oliveira, Tobias Pereira de Moraes e Mônica Anater, estudantes dedicados que abonaram a minha formação com tamanha e valorosa amizade, em especial, ao Fernando por me ajudar nas coletas e cálculos estatísticos que permitiram a concretização deste trabalho;

A professora Maria de Fátima Grassi, da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, pela dedicação e preocupação em bem me receber na sua casa durante a concretização do meu trabalho de conclusão de curso, pela colaboração e esforços que empenhou no intuito de colaborar com este trabalho e pela profissional e pessoa magnífica que sem dúvida é;

Ao Centro Acadêmico Charles Darwin, um local que muito me ensinou, que fez parte ativamente da minha vida acadêmica, um ambiente que de modo inestimável colaborou com o meu crescimento, pessoal e social, que ofertou situações de superação e luta, um órgão que me permitiu contestar irregularidades e propor melhorias, um local de conquistas e de boas amizades;

Ao professor Luiz Eduardo Aparecido Grassi, da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, que para a minha felicidade se tornou o meu orientador, um profissional dedicado e inconformado com a não qualidade de ensino, com os erros que interferem na

boa formação acadêmica e com as deficiências do ensino superior. Um docente, sem qualquer exagero, que não se cala frente às tantas infelicidades, continuando o seu paradigma e assim, ensinando cidadania a todos os seus alunos, externando um amplo conhecimento científico, anti-horário a deficiência e claudicância da ciência unilateral, do conhecimento factual e do egoísmo típico da produção científica sem valores. Agradeço pelo companheirismo e respeito que ofertou e sempre oferta a seus alunos, pelo aceite das contestações e pela abertura de opulentos momentos de diálogo. Pelos feriados e domingos investidos em seus alunos para orientação de trabalhos e apoio nas dificuldades pessoais, em especial, pelos exemplos que nos deu, algo tão animador que levou-me a crer que nem todos somos egoístas e que ainda existem professores de tamanha lisura, sensibilizados a lutar por um ensino público de qualidade.

Um Muito Obrigado a Todos!

RESUMO

O equilíbrio e a qualidade dos ambientes aquáticos é um aspecto fundamental, e, portanto, indispensável, não somente ao se considerar a produção animal e a saúde do homem, mas também, ao se inferir sobre a conservação da biodiversidade de organismos e ambientes. Considerando as necessidades do monitoramento ambiental é que surge a ecotoxicologia aquática, uma ferramenta a qual permite detectar, prever e remediar ambientes aquáticos, vítimas da ação negativa causada pelos xenobióticos. Considerando tais aspectos, o objetivo deste trabalho visa analisar os elementos sanguíneos da circulação periférica, como as células da série branca, e efetuar contagem diferencial dos seus tipos, bem como determinar a frequência de micronúcleos em eritrócitos de um peixe teleósteo de água, amplamente distribuído em todo o território nacional, o *Astyanax bimaculatus*. Os estudos realizados com estes animais sob condições de confinamento revelaram que os elementos da série branca predominante foram os do tipo agranulares como os linfócitos (65,40%), seguidos, respectivamente por monócitos (17,51%), neutrófilos (14,24%) e basófilos (02,83%). A frequência de micronúcleos apontou para a existência de agentes genotóxicos no ambiente aquático estudado, já que em 44% da população amostrada observou-se a ocorrência significativa de estruturas que indicam efeitos genotóxicos. A metodologia utilizada para a retirada de alíquota sanguínea da circulação periférica permitiu bons resultados e a sobrevivência dos exemplares amostrados, cumprindo os objetivos conservacionistas e éticos da proposta.

Palavras-chaves: Teleósteos, Hematologia, Genotoxicidade, Ecotoxicologia

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1- Tipos celulares encontrados para <i>Astyanax bimaculatus</i> (valor médio).....	22
Tabela 2- Tipos celulares encontrados para <i>Astyanax bimaculatus</i> (valores totais)....	22
Tabela 3- Frequência de micronúcleos.....	26
Tabela 4- Frequência de micronúcleos (análise univariada).....	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 – Tanques experimentais de confinamento de peixes.....	16
Figura 2 – Captura dos exemplares.....	17
Figura 3 – Número de células da série branca em <i>Astyanax bimaculatus</i> coletados durante período inverno/seca em valores absolutos.....	23
Figura 4 – Número de células da série branca em <i>Astyanax bimaculatus</i> coletados durante período verão/chuvoso em valores absolutos.....	23
Figura 5 – Tipos celulares da série branca encontrados em <i>Astyanax bimaculatus</i>	24
Figura 6 – Frequência de micronúcleos em eritrócitos da circulação periférica.....	25
Figura 7 – Série Vermelha em <i>Astyanax bimaculatus</i> eritrócitos sem alterações.....	27

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO.....	11
OBJETIVOS.....	15
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	33

INTRODUÇÃO

O crescimento dos centros urbanos, a constante expansão de seus limites, e a insuficiência ou inexistência de práticas adequadas de saneamento, destino de resíduos sólidos, contemporaneamente é uma realidade facilmente perceptível, e na confluência com estas características do meio urbano, a atividade agropecuária também se projeta de maneira expansiva e inapropriada, usando dos espaços fronteiros aos ambientes naturais e cursos d'água. A proximidade entre o ambiente antropizado ou voltado a produção agropecuária com os ambientes naturais pode acabar resultando em alterações significativas aos ecossistemas e aos organismos vivos nestes presentes, que sobrevivem em função dos recursos naturais, incluindo populações humanas.

A sanidade humana é outro aspecto de relevância, de acordo com Holdgate (1979) a atividade antrópica provoca alterações ambientais significativas, tanto na área urbana quanto na rural. Muitos dos materiais relacionados às áreas de ocupação humana provocam impactos ambientais e oferecem riscos à saúde do homem.

Os posteriores resultados de ação antrópica sobre os organismos vivos, e que condicionam modificações nos ambientes naturais e necessitam de considerações tangíveis e de relevância, requerendo estudos científicos mais aprofundados, visando o monitoramento das condições e a preservação dos ambientes naturais. A natureza e o aprofundamento dos estudos científicos possibilitarão a sugestão de ações preditivas, profiláticas ou paliativas a efeitos contínuos e degradantes ao meio.

A influência das atividades humanas sobre as características do meio e os potenciais riscos às espécies nativas ou exóticas cultivadas, precisam ser melhor estudadas para a geração de subsídios que possam ser utilizados como indicadores da condição destes ambientes e a natureza dos riscos aos quais se expõem às espécies que os habitam (SINGH *et al*, 2009). Para este tipo de estudo, torna-se necessário o emprego de matrizes ambientais, como indicadores que estejam expostos ou associados aos fatores de risco. Alguns exemplares da fauna de determinados ambientes são mais adequados, pois apresentam características ecológicas fundamentais, como relações tróficas abrangentes, ampla distribuição territorial, resistência e adaptabilidade, podendo ser desta forma descrita a espécie abordada neste estudo, *Astyanax bimaculatus*, Linnaeus (1758).

O Brasil é extremamente beneficiado por possuir uma enorme gama de mananciais e cursos d'água. Sabe-se, de acordo com Esteves (1998) que o país, no que diz respeito à quantidade de água, é dono da maior reserva de água doce, com seus rios e lagos distribuídos por todo seu território, apresentando clima e condições limnológicas favoráveis a grande diversidade de espécies de peixes e outros organismos aquáticos. No entanto, o país sofre com os contrastes do progresso agropecuário e industrial, expondo os diversos ambientes naturais, em seu território, ao efeito de xenobióticos e a uma grande diversidade de poluentes, substâncias características da atividade humana que não são encontradas na natureza em determinadas concentrações, como os resíduos de metais. Tais substâncias, resíduos oriundos da produção industrial, da produção agrícola e dos esgotos urbanos, são posteriormente, destinados aos cursos d'água por vários meios, pelo despejo direto, pela ação das chuvas como carreadora de substâncias, pelo processo erosivo de áreas de produção e conseqüente, deposição e assoreamento, pela dispersão área, ou por precipitação pluviométrica, que, possivelmente, ao se estabelecerem em rios, córregos e lagos, podem representar riscos com grande potencial de causar alterações químicas e biológicas muito significativas a qualidade da água, dos ecossistemas aquáticos e dos seres vivos neles presentes ou a eles associados.

A partir destas premissas, evidencia-se a necessidade de se avaliar o grau das alterações provocadas por atividade antropogênica, sendo este o principal objetivo da ecotoxicologia, definida por Ramade (1977) como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambientes por poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera. Neste campo, a ecotoxicologia aquática é uma eficaz ferramenta para se verificar mudanças ambientais, sendo utilizada como avaliadora da presença de xenobióticos específicos sobre fontes hídricas. Caracteriza-se pela observação dos organismos vivos por meio de análises histológicas, hematológicas ou bioquímicas a partir das amostragens, além de se atentar para as observações comportamentais.

A análise hematológica, entre os demais parâmetros que servem aos ensaios ecotoxicológicos, é, segundo Ishikawa *et al* (2008) uma importante ferramenta para o

processo de diagnóstico de doenças. As técnicas usadas em mamíferos são amplamente aplicadas em peixes, no entanto, com algumas modificações.

Qualquer organismo vivo pode servir como um indicador da presença de substâncias estranhas ou agressões biológicas que tenham a capacidade de comprometer a sanidade do meio aquático ou de um grupo de organismos específicos, contudo, os peixes se destacam neste tipo de estudo em função das muitas vantagens que oferecem, como a sensibilidade a poluentes, a íntima semelhança tecidual e celular que conservam em relação aos mamíferos, e a facilidade no manejo e da manutenção em cativeiro. Além do fato de que as hemácias do sangue periférico, em peixes, apresenta-se nucleadas, sendo o sangue um tecido de fácil amostragem, possibilitando ainda a sobrevivência dos animais amostrados.

O lambari do rabo amarelo, *Astyanax bimaculatus*, é um peixe teleósteo da ordem Characiforme, pertencente à família Characidae, amplamente distribuído e presente nos cursos e reservatórios de água doce no Brasil, que se caracteriza por demonstrar uma grande plasticidade, considerando as relações tróficas e de grande importância quanto à indicação de qualidade do ambiente aquático. Um animal oportunista que mantém hábitos alimentares bastante diversificados e que apresenta alta suscetibilidade às mudanças ambientais ou ainda, a mínimas alterações no grau de qualidade da água, principalmente em relação ao nível de concentração do oxigênio dissolvido, sendo capazes de respostas comportamentais e prováveis alterações na configuração tecidual e hematológica.

O estudo de micronúcleos, em eritrócitos do sangue periférico é um dos aspectos das respostas em peixes, que nos permitem inferir sobre a presença de xenobióticos no ambiente aquático contribuindo para o monitoramento ambiental. De acordo com Ranzani-Paiva (1981), as variáveis hematológicas são fundamentais como critérios de avaliação das condições fisiológicas e das relações das mesmas com o ambiente, em qualquer grupo animal.

A análise hematológica atende a necessidade constante de monitoramento das condições ambientais, esta, importante para garantir não unicamente os parâmetros adequados de sobrevivência dos diversos organismos vivos, mas também a sanidade humana, principalmente quando se considera o consumo de água para os diversos fins. Na prerrogativa de entender as possíveis alterações e vulnerabilidades dos ecossistemas

aquáticos e que interfiram em seu equilíbrio e das populações destes dependentes, a hematologia pode ser uma excelente ferramenta de análise.

Além das análises hematológicas, uma outra forma de se avaliar possíveis efeitos de substâncias químicas, agentes físicos ou os resultados do conjunto de condições ambientais nos organismos é a influência destes sobre o material genético, sendo definidos como efeitos genotóxicos, ou seja, aqueles que podem provocar alterações no material genético das espécies. Uma das técnicas utilizadas para tais estudos seria a técnica de determinação da frequência de micronúcleos sendo que a mesma pode ser aplicada em diferentes organismos vivos, vegetais ou animais.

De acordo com Andrade *et al* (2005), o micronúcleo consiste numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza próximo ao núcleo. A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA (ácido desorribonucléico), dias ou semanas após a ação de carcinógenos quando as células estão em divisão. São constituídos, portanto, de fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos ou aberrantes que não foram incluídos no núcleo após a conclusão da mitose. Assim, a ocorrência de micronúcleo pode refletir a presença de agentes genotóxicos. Grassi (2002) aplicou a técnica de micronúcleo para estudos relativos a determinação de efeitos genotóxicos em peixes dos Rios Jaguari e Atibaia (SP/BR), obtendo bons resultados e confirmando genotoxicidade em tais ambientes, sendo tais resultados acompanhados por análises limnológicas dos ambientes que indicavam sério comprometimento das condições naturais.

Existem ainda outros aspectos utilizados para se detectar modificações no quadro de saúde nos animais; um exemplo é a indicação de alterações provocadas pela presença de patógenos, que podem ser apontados pela contagem e diferencial de elementos da série branca (RANZANI –PAIVA, 1981).

O sangue é um tecido responsável pela distribuição de calor, transporte de gases, nutrientes e produtos de excreção, além de efetuar a defesa do organismo. A presença, a quantidade e a proporção das diferentes células no sangue periférico (vascular) reflete o estado fisiológico do organismo, apresentando ampla variação em função de fatores externos e internos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Para a caracterização de células da série branca em peixes teleósteos verifica-se que, apesar da importância dos estudos, para espécies nativas, esta área necessita de um maior número de análises que abordem características como a tipologia de leucócitos, associação de determinados tipos de série branca a agentes infecciosos e peculiaridades relativas as espécies, bem como outros aspectos hematológicos.

Desta forma, este estudo pretende colaborar com esta área do conhecimento por meio de análises para a tipificação de células da série branca em *Astyanax bimaculatus* e verificar a possibilidade de ocorrência de efeitos genotóxicos na espécie em condições de cativeiro

OBJETIVOS

Realizar a contagem diferencial de células da série branca em uma espécie de teleósteo nativo, *Astyanax bimaculatus* em condições de cativeiro.

Inferir sobre a frequência de micronúcleos como indicativo de efeito genotóxico induzido por substâncias naturais ou substâncias sintéticas.

Comprovar a eficácia de metodologia para amostragem sanguínea pela punção da artéria caudal destinada a confecção de lâminas para o método de esfregaço, com redução da mortalidade de animais na amostragem.

MATERIAL E MÉTODOS

Área Experimental

Os exemplares foram mantidos em 2 tanques escavados e revestidos com lona plástica com dimensões de 10x5x1m (fig.1), em área do campus da Universidade Estadual do Mato grosso do Sul (UEMS), localizada no município de Dourados-MS. Os tanques são abastecidos a partir do reservatório próximo á área experimental, sendo que os tanques possuem registros de admissão individual de água. Este tanque recebeu, durante o processo de instalação, 5 quilos de solo do local . A introdução de espécies de macrófitas aquáticas



Figura 1 – Tanques experimentais de confinamento de peixes.

como *Eichhornia crassipes*, fito e zooplâncton, foi efetuada com material proveniente do Rio Miranda – MS, região do Pantanal, em duas etapas, e do Rio Iguatemi – MS, havendo posteriormente, permuta de material entre os tanques, com o objetivo de uniformização em relação às espécies, fito e zooplancônicas. Estes procedimentos visaram iniciar o

povoamento por organismos aquáticos para a obtenção de características próximas das naturais, incluindo a oferta de itens alimentares naturais para as espécies de peixes.

Após a coleta para a introdução de plantas aquáticas foram realizadas coletas de várias espécies de peixes (8), sendo uma delas a espécie de estudo *Astyanax bimaculatus*, com um lote inicial de 60 animais, clinicamente, com boa sanidade. Posteriormente à fase de adaptação os animais se reproduziram até atingir a população atual de amostragem.

Captura dos Animais

A captura dos animais para o experimento foi realizada em dois períodos, sendo que em cada um deles foram capturados 25 exemplares, com tamanho médio entre 4,5 a 8 cm de comprimento e pesando de 4 à 8,5 g.



Figura 2 – Captura dos exemplares.

As coletas se deram no mês de novembro de 2009 (primeira bateria) e abril de 2010 (segunda bateria), utilizando uma rede de arrasto (picaré) com malhas de 1 cm, 10mx2m com “saco” de 2,5m.

Os peixes foram rapidamente transportados dos locais de coleta em caixas de 25L, com aeração natural até o local de estudo (Laboratório de Ecofisiologia LEF/UEMS). Após a coleta de sangue, os espécimes foram devolvidos aos tanques de cultivo.

Amostragem e Análise Hematológica

Em cada bateria, foram coletadas amostras sanguíneas de 25 indivíduos utilizando seringas hipodérmicas de vidro de 3 ml e agulhas heparinizadas. O anticoagulante utilizado foi a heparina (Liquemine), sem prévia diluição e com súbita imersão das agulhas e tomada de alíquota suficiente para banhar a região inicial do embolo da seringa, no ato da amostragem.

Os animais, durante todo o processo metodológico, foram manipulados respeitando os princípios éticos e objetivando o mínimo de injúrias possíveis, tal que, após a amostragem, fosse lhes garantida a sobrevivência.

Dos indivíduos amostrados foi retirada uma pequena alíquota de sangue por meio de punção da artéria caudal tal que proporcionasse a boa efetivação do método de esfregaço sem implicações de sacrifícios. Após a amostragem todos os indivíduos foram devolvidos à caixa de transporte e levados de volta ao tanque experimental.

Usaram-se lâminas de ponta fosca, devidamente higienizadas e numeradas conforme o número e a bateria de amostragem do indivíduo, seguindo o processo de esfregaço de sangue.

Aplicou-se o material (gota de sangue periférico) próximo a ponta fosca da lâmina. De cima para a direção oposta, encostou-se uma segunda lâmina na borda da gota de sangue. Esta, naturalmente corre e se espalha ao longo da borda enquanto segue-se com a segunda lâmina para direção oposta respeitando-se uma inclinação de 70 graus, em um único movimento até o fim da borda da lâmina que recebeu o material.

Para os 25 indivíduos de cada uma das duas baterias foram utilizados dois tipos de colorações, e, portanto, produzidas duas lâminas para cada indivíduo. Para a contagem e

diferenciação de células da séria branca utilizou-se a solução corante Leishman e para identificação e frequência de micronúcleo em eritrócitos usou-se o método da Reação de Feulgen – hidrólise em HCl 5 N, a temperatura ambiente, durante 20 minutos, lavagem em água destilada ($\pm 5^\circ$ C), lavagem em água corrente, secagem à temperatura ambiente, imersão em Reativo de Schiff (120 minutos), à temperatura ambiente, em ambiente escuro, lavagem rápida em água destilada, secagem à temperatura ambiente; imersão em solução de Fast-Green ácido (1 minuto), lavagem rápida em água destilada e secagem à temperatura ambiente.

A frequência de micronúcleos |MN| foi determinada em eritrócitos da circulação periférica, segundo a metodologia proposta por (SCHMID, 1975).

Determinou-se que seriam considerados válidos para efeito de genotoxinas, apenas os casos com ocorrência de |MN| em, no mínimo, 3 células a cada 1.000; estruturas refringentes não devem ser consideradas como |MNs| como proposto por (SCHMID, 1975); a coloração do MN deve ser idêntica a do núcleo; apenas eritrócitos individualizados com formato oval e citoplasma intacto devem ser contados, evitando-se células sobrepostas ou que apresentem dobras; considera-se |MN| estruturas menores ou iguais a um terço do núcleo principal e claramente separados.

Foram contados 1000 eritrócitos por animal, sob microscopia óptica comum, em resolução de 10 X 125, em imersão.

Para diferenciação e quantificação das células da séria branca, utilizou-se também o material corado pelo método de Reação de Feulgen, pelo grande número de células que puderam ser caracterizadas neste tipo de coloração e também pela boa qualidade obtida nessas lâminas.

Na coloração usando o corante Leishman, obedeceu-se o seguinte protocolo: imediatamente, após o esfregaço, as lâminas foram deixadas sob secagem em temperatura ambiente e fixadas em metanol por dois minutos, sendo, posteriormente, lavadas em água corrente e devidamente acondicionadas ao abrigo de luz. No processo de coloração, após a confecção do esfregaço e rápida secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram imersas em cubas de 200 ml do corante Leishman por 3 minutos, rapidamente lavadas em água corrente e novamente expostas à temperatura ambiente para secagem.

A caracterização de leucócitos seguiu a metodologia descrita em (RANZANI-PAIVA, 1981; ROBERTS, 1981) e foi realizada por meio de microscopia óptica, com lente objetiva de imersão.

A análise estatística univariada e teste T para duas amostras foram realizadas utilizando o programa Past, enquanto que, para a elaboração dos gráficos utilizou-se o programa Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a análise geral dos elementos da série branca observou-se uma considerável diversidade de tipos celulares. A coloração para a contagem diferencial e a tipificação dos elementos da série branca proposta na metodologia baseou-se na utilização do corante Leishman. No entanto, as preparações não apresentaram resultados satisfatórios. Entretanto, a coloração para contagem de micronúcleos empregando a Reação de Feulgen apresentou excelentes resultados para a coloração dos elementos da série branca, sendo a contagem diferencial efetuada a partir das lâminas utilizadas para a contagem de micronúcleo. Estas preparações permitiram evidenciar o núcleo e conteúdo citoplasmático, com razoável contraste e diferenças nos padrões de cores, entre núcleo e citoplasma, bem como em alguns tipos celulares a observação de grânulos, como no caso de basófilos.

Em *Astyanax bimaculatus*, neste estudo foram encontradas as seguintes células da série branca: linfócitos, monócitos, neutrófilos e basófilos de acordo com os valores observados nas tabelas 1, 2 e figura 3 e 4, sendo indicados os tipos na figura 5. Comparando-se os valores obtidos com aqueles encontrados na literatura para peixes teleósteos, observou-se que o número de linfócitos em *A. bimaculatus*, que neste estudo foi de 65,4% é similar aos valores encontrados para as outras espécies. Os valores observados na literatura, portanto, encontram-se ajustados à faixa de valores, maiores ou menores, de acordo com as espécies, variando os mesmos de 19,7% a 95,5% Ranzani-Paiva (1981) e Roberts (1981). Os valores em *A. bimaculatus* para os demais tipos celulares também se apresentam dentro da faixa de variação encontrada na literatura, como o verificado na tabela 4. Apesar das diferenças observadas em relação aos elementos da série branca comparando-se as duas épocas de amostragem, essas diferenças não foram significativas, ($p > 0,6$). Porém se observa um discreto aumento do número de células na segunda amostragem. Este efeito pode ser atribuído ao estresse do período reprodutivo.

Durante este período que coincide com o verão, a maioria das espécies de água doce, apresenta intensa atividade em função da reprodução e conseqüentes gastos metabólicos e

variações hormonais, que se refletem nos índices hematológicos, o que se verificou na espécie em estudo.

Além dos detalhes ligados à reprodução, uma diferença ambiental marcante durante o período de verão é o aumento da atividade da maioria dos predadores, parasitas e organismos infecciosos, como bactérias e fungos, e que também pode estar ligada a presença de agentes xenobióticos, (SINGH *et al*, 2009).

Tabela 1 – Tipos celulares encontrados em exemplares de *Astyanax bimaculatus* nos dois períodos de amostragens, apresentados em valores totais, médios, percentuais e desvio padrão (n = 25).

Tipos Celulares	1ª Amostragem Fim do Período de Inverno/Seca Novembro/2009	2ª Amostragem Fim do Período de Verão/Chuvoso Abril/2010
Linfócitos	1971 T	2222 T
	78,84 M	88,88 M
	63,0725 Dp	67,4279 Dp
	67.61 %	63.55 %
Monócitos	440 T	683 T
	19,13 M	29,542 M
	17,5071 Dp	28,3253 Dp
	15.09 %	19.53 %
Neutrófilos	415 T	498 T
	18,043 M	20,75 M
	21,0614 Dp	17,9998 Dp
	14.23 %	14.24 %
Basófilos	89 T	93 T
	3,56 M	3,72 M
	4,3309 Dp	5,71198 Dp
	3.05 %	2.66 %

Legenda: T– Número total; M – Média; % – Valor percentual; Dp – Desvio padrão.

Tabela 2 – Tipos celulares encontrados em *Astyanax bimaculatus* apresentados em valores totais e percentuais do total (n = 50).

AMOSTRAGENS	Lf	%	Mn	%	Nt	%	Bs	%
Total	4.193	65.40	1.123	17.51	913	14.24	182	02.83

Legenda: Lf – Linfócito; Mn – Monócito; Nt – Neutrófilo; Bs – Basófilo.

As diferenças então observadas considerando as duas épocas de amostragem podem ser atribuídas a fatores como sexo, idade, ou o fato de alguns animais apresentarem, em hipótese, um quadro infeccioso ou de toxicidade.

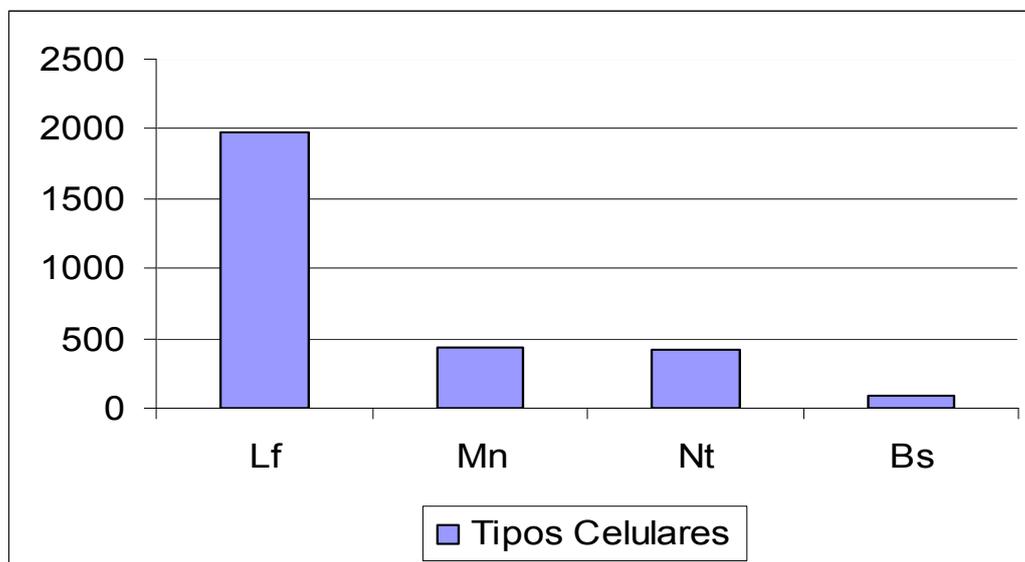


Figura 3 – Número de células da série branca em *Astyanax bimaculatus* (n = 25) coletados durante período inverno/seca (novembro/2009) em valores absolutos Linfócito (Lf); Monócito (Mn); Neutrófilo (Nt); Basófilo (Bs).

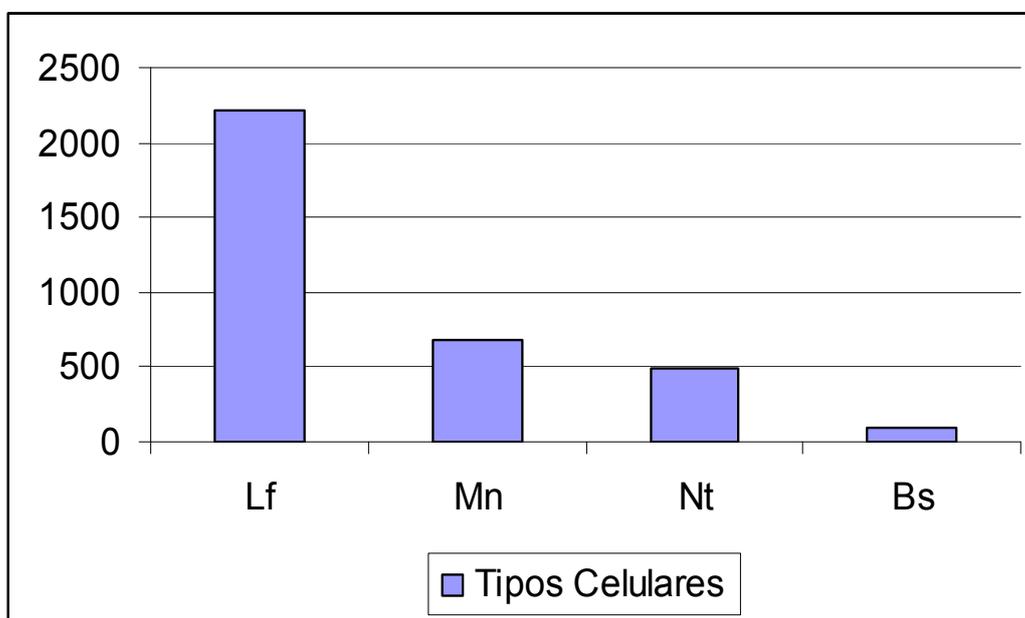


Figura 4 – Número de células da série branca em *Astyanax bimaculatus* (n = 25) coletados durante período verão/chuvoso (Abril/2010) em valores absolutos. Linfócito (Lf); Monócito (Mn); Neutrófilo (Nt); Basófilo (Bs).

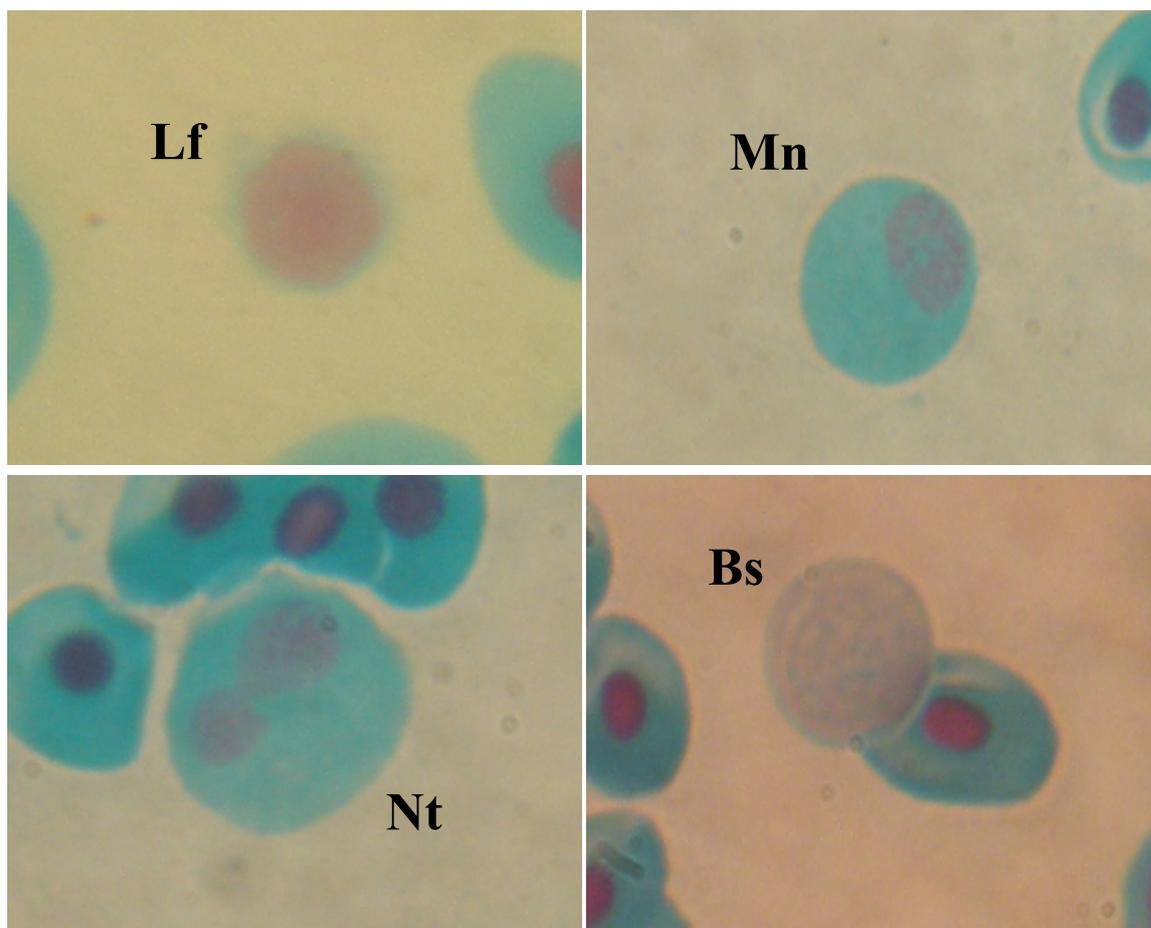


Figura 5 – Tipos celulares da série branca encontrados em *Astyanax bimaculatus*: Linfócito (Lf); Monócito (Mn); Neutrófilo (Nt); Basófilo (Bs). PAS,1000x

Alguns exemplares apresentaram valores da série branca acima da média da população amostrada; estes resultados poderiam indicar um quadro de saúde diferenciado. Outro aspecto que deve ser ressaltado em relação aos valores de série branca, similares nos dois períodos de amostragem, é o fato que nos ambientes de coleta tem sido observado que os animais iniciam o seu período reprodutivo a partir de setembro e o ciclo continua até meados de abril. Assim, a população amostrada teria o efeito da reprodução sobre os aspectos hematológicos distribuído de forma similar em ambas às amostras, mas, indicando ligeiro aumento dos elementos da série branca no fim do período reprodutivo.

Outra hipótese que corrobora a afirmação de efeitos de um quadro infeccioso ou de toxicidade serem as causas para valores acima da média quanto ao número de linfócitos, em

alguns exemplares, é o fato de alguns deles apresentarem uma maior frequência de micronúcleos, (figura 6).

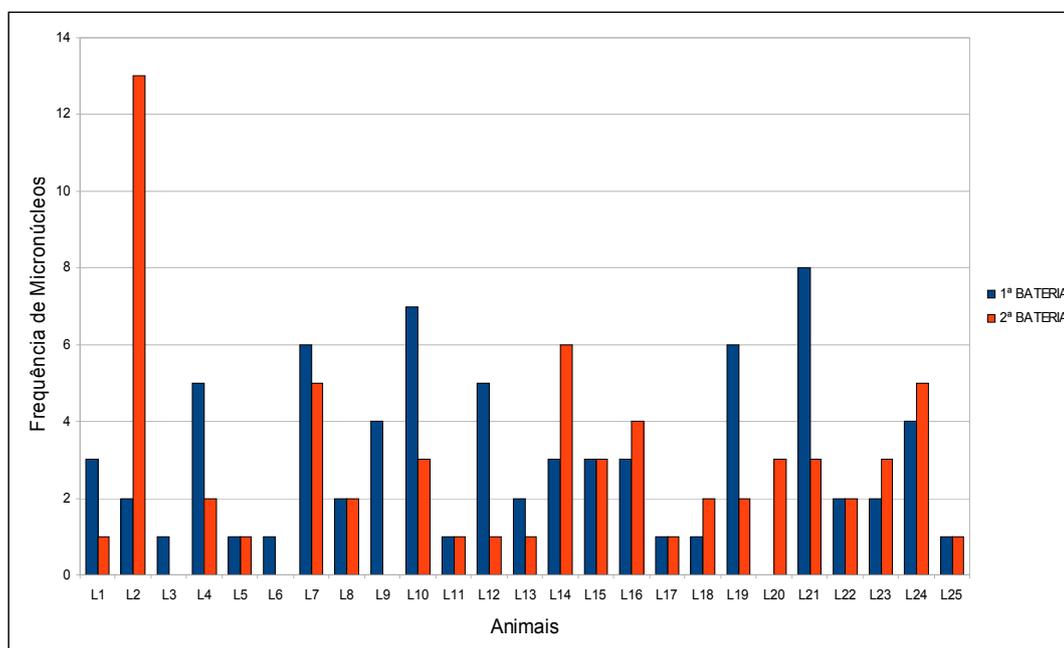


Figura 6 – Frequência de micronúcleos em eritrócitos da circulação periférica determinada em *Astyanax bimaculatus* para duas amostras, inverno/seca n = 25 e verão/chuvoso n = 25.

O exemplar 2 da segunda amostragem, apresentou o maior número de micronúcleos (13) do total de amostras, e apresentou também o maior número de linfócitos (226), sugerindo uma relação entre números de micronúcleos e características da série branca. No entanto, o exemplar 21 da primeira amostragem apresentou valor elevado de micronúcleos (8), porém, o número de linfócitos (50), mostrou-se abaixo da média desta variável determinada para a espécie neste estudo. Assim, não se pode afirmar que haja uma relação entre o número de micronúcleos e os elementos da série branca em *Astyanax bimaculatus*, nas condições experimentais deste estudo.

A frequência de micronúcleos determinadas para as duas amostras evidenciaram efeito genotóxico na maioria dos exemplares, sendo significativa a contagem em 48% (n = 25) dos animais da primeira amostragem e de 40% (n = 25) na segunda amostragem, (tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Frequência de micronúcleos em eritrócitos determinada em *Astyanax bimaculatus*, (n = 25) apresentados em valores absolutos e percentuais das amostragens de inverno/seca e verão/chuvoso.

	Nº de exemplares com micronúcleos do total amostrado	% de exemplares com micronúcleos do total amostrado	Exemplares com significativo micronúcleos	Nº de Nº de exemplares com significativo de micronúcleos
1ª Amostragem	24	96%	12	48%
2ª Amostragem	22	88%	10	40%

Tabela 4 – Frequência de micronúcleos em eritrócitos determinada em *Astyanax bimaculatus*, valores comparados por análise univariada e teste T para duas amostras, inverno/seca e verão/chuvoso (n = 25).

	1ª Amostragem	2ª Amostragem
Média	2,96	2,6
Desvio Padrão	2,15	2,69
Valor de p	0,6	

p < 0,05.

Os resultados indicaram que as condições ou agentes que provocam o efeito de genotoxicidade agem ou estão presentes de forma semelhante ao longo de todo o período de amostragem, sendo verificado na maioria dos animais e de maneira significativa em praticamente 50% da população. No entanto, quando comparados os resultados das duas amostras, não se verificaram diferenças significativas ($P > 0,6$) entre as mesmas quanto ao número de micronúcleos em eritrócitos. Assim, pode-se inferir, de um modo geral que o efeito esteja distribuído uniformemente na população, sendo constatado em 96% da primeira amostragem e 88% da segunda amostragem, embora, significativo em cerca de 50%, (tabela 3 e figura 7).

Entretanto, apesar de não significativas as diferenças entre as duas amostragens, observou-se que a população da primeira amostragem apresenta valores maiores de micronúcleos em um número superior de exemplares (12). Este efeito poderia ser atribuído pelo fato da população amostrada ter sido exposta aos efeitos do inverno e da seca. No ambiente de estudo, observou-se que durante o período de inverno/seca a população de algas diminui, no entanto, ocorre maior evaporação da água contida nos tanques experimentais, o que, conseqüentemente, obriga o abastecimento constante dos tanques com a reposição do volume de água, e, isto poderia provocar um efeito de concentração de

possíveis agentes químicos, provenientes da água de abastecimento. A água de abastecimento dos tanques é proveniente de poço que recebe tratamento a base de cloro. O tratamento, por si próprio, é um fornecedor de xenobióticos, que em determinados gradientes de concentração, se torna capaz de atuar como um potencial agente mutagênico, como o verificado por Scarpato *et al* (1990), que relataram os efeitos da água clorada na indução de micronúcleos em moluscos de água doce.

Além do possível efeito do cloro proveniente do tratamento da água que abastece os tanques experimentais, a fonte de água, o lençol freático, pode estar sujeito a contaminação por agentes químicos oriundos da atividade agropecuária na região. No entanto, a comprovação de tal hipótese dependeria de análise cromatográfica da água armazenada no

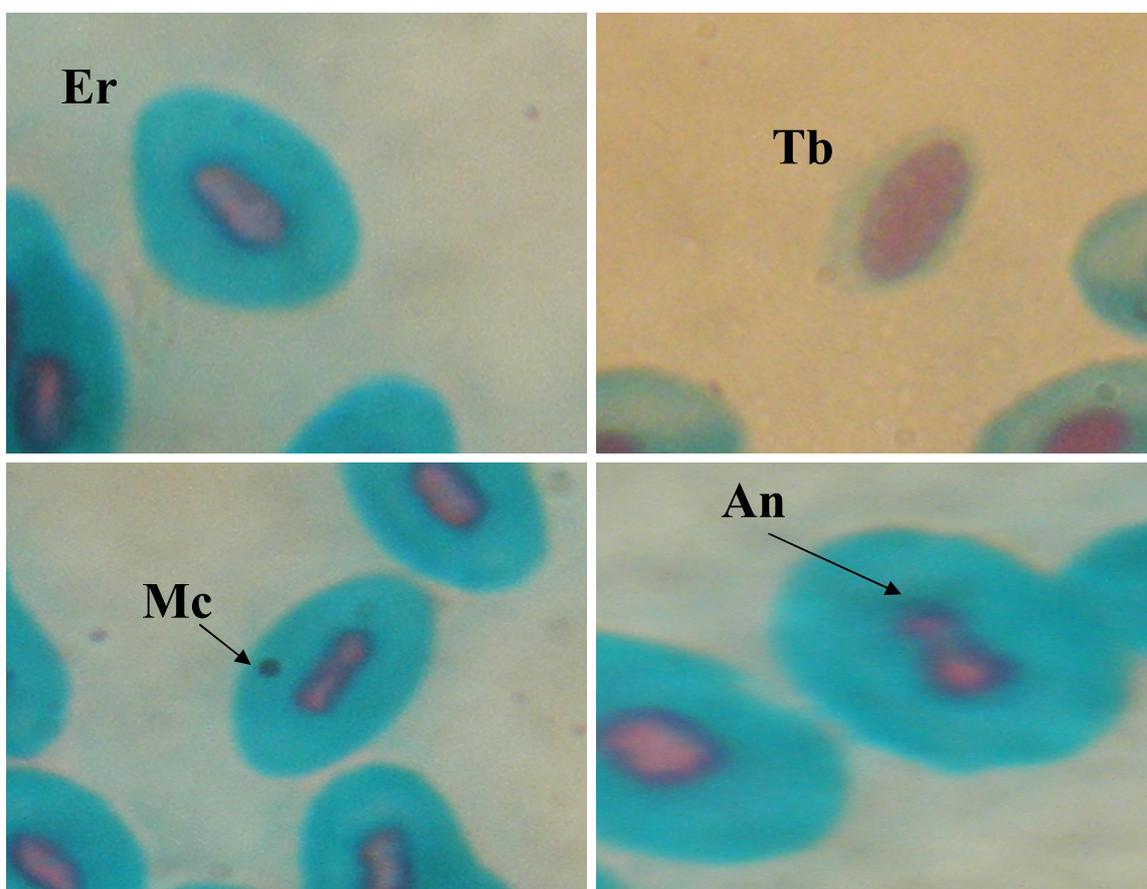


Figura 7 - Série Vermelha em *Astyanax bimaculatus*: eritrócito sem alterações (Er); Trombócito (Tb); Micronúcleo em eritrócito (Mc); Anomalia nuclear em eritrócito (An). PAS,1000x.

subsolo (GRASSI, 2002; RAMADE, 1977).

Uma outra hipótese para a origem dos efeitos genotóxicos observados seria a produção de toxinas liberadas por algas ou macrófitas aquáticas. Esta hipótese foi levantada em trabalho anterior na mesma área, com a mesma espécie de objeto de estudo deste trabalho, (BERTI, 2007). Um aspecto ecológico da espécie que corrobora tal hipótese abordada neste estudo é o fato da mesma se alimentar de raízes de aguapé, *Eichhornia crassipes* e provavelmente, de *Salvinia molesta* nas condições de confinamento deste estudo. Este comportamento é freqüentemente observado no local, principalmente durante o período de inverno/seco, quando há uma diminuição considerável no número de insetos e outros organismos aquáticos, base de alimentação da espécie. Tais macrófitas são dotadas da capacidade de, em simbiose com microorganismos, metabolizar e acumular determinados metais que possuem o potencial genotóxico, (MIRANDA *et al*, 2007; OLIVEIRA *et al*, 2001). Ainda em relação à produção de toxinas por organismos vegetais, considera-se a hipótese de liberação destes agentes por algas em ambientes eutrofisados (BRANDÃO, 2008; MANFRA JÚNIOR, 2005). Os tanques acumulam materiais dispersos pelo ar (poeira) que seriam a fonte de nutrientes para a produção de algas, como pode ser verificado pela quantidade de matéria orgânica acumulada no fundo dos tanques, e também, pela produção de macrófitas que ocupam, em determinadas épocas, toda a superfície do tanque, (BRANDÃO, 2008). Normalmente, a toxicidade de microalgas tem maior expressividade quando a sua população é aumentada no ambiente aquático, entretanto, Van-Dolah (2000) afirma que, em alguns casos, mesmo as baixas concentrações de microalgas já são suficientes para manifestar um efeito danoso, o que caracteriza o efeito de floração. Outro aspecto relevante que pode ser associado aos resultados é o descrito por Resende e Machado (2004) que identificaram um maior florescimento de algas, produtoras de toxinas no período de abril a julho, períodos característicos de menores temperaturas. Assim, no caso em estudo, se algas tóxicas apresentam maior floração no período de inverno/seco, os animais amostrados em período posterior, novembro, certamente foram expostos aos efeitos destas algas.

Um outro aspecto que favorece o acúmulo de matéria orgânica é o revestimento de lona dos tanques, sendo a lona, outra possível fonte de elementos xenobióticos, embora, não se tenha, por hora, a possibilidade de comprovar tal hipótese. Contudo, sabe-se que a

lona plástica, por se tratar de um polímero sintético, apresenta um certo grau de toxicidade a qualquer organismo, embora, de acordo com a literatura, esses níveis de toxicidade sejam mínimos, ainda assim se configura uma oferta de resíduos químicos para o ambiente aquático em questão (SOARES et al., 2002).

Ainda há outras ofertas de agentes químicos com potencial mutagênico que podem ser inferidos por estarem presentes no ambiente pesquisado. Todavia, pode-se acreditar, mesmo que remotamente, que os efeitos genotóxicos observados sejam em consequência do acúmulo de metais como o cromo em sua forma de trivalência, elemento fornecido por meio da ração a base de milho. De acordo com Fujimoto *et al* (2008), o cromo em sua forma trivalente não é tóxico aos organismos, por não conseguir transpassar pelas membranas celulares, sendo um elemento não reativo, facilmente metabolizado e eliminado. Contudo, o cromo na sua forma hexavalente é altamente tóxico à saúde dos organismos, podendo atravessar as membranas celulares e nucleares com grande facilidade, passando a reagir com proteínas e ácidos nucleicos no interior da célula.

Dentro das observações de Richard e Bourg (1991), percebe-se que a concentração, tanto de cromo trivalente como de cromo em seu estado hexavalente nos ambientes aquáticos, é regulada pela reação de oxi-redução, ou seja, a transformação do cromo trivalente em hexavalente ou vice versa, que pode acontecer apenas na presença de outro par redox, no qual recebe ou libera os três elétrons necessários para ocorrer à reação. Em ambientes aquáticos poluídos a concentração de oxigênio é baixa e a redução do cromo trivalente para hexavalente é favorecida, sendo facilmente absorvido por seres constituintes do ecossistema local.

Como anteriormente inferido, a hipótese em discussão é remota, já que o ambiente em estudo não apresenta características de ambientes poluídos, mas foi considerada em virtude de que, em determinadas épocas os tanques encontravam-se densamente povoados por macrófitas aquáticas e com pouca renovação de água e eventualmente recebe rações a base de milho em função da diminuição de itens naturais da dieta, insetos e outros invertebrados aquáticos.

Entre as células observadas, notou-se também a presença de trombócitos, células responsáveis pela coagulação do sangue, e de grande importância para a prevenção de perda de fluidos teciduais em decorrência de lesões superficiais. Tipicamente são células

alargadas e fusiformes (ROBERTS, 1981). Em *Astyanax bimaculatus*, estas células apresentam-se em tamanho inferior aos eritrócitos, de forma alongada, com um núcleo reniforme/ovalado e ocupando a maior parte do volume celular e de observação rara nas lâminas, o que denota que os animais amostrados não teriam sofrido injúrias físicas durante o período anterior a amostragem..

CONCLUSÃO

Os elementos da série branca em contagem diferencial encontrados para *Astyanax bimaculatus* foram:

Linfócitos - 65,40%,

Monócitos – 17,51%,

Neutrófilos – 14,24%

Basófilos – 02,83%.

Constatou-se que não houve alterações significativas, comparando-se os exemplares das duas épocas de amostragem ($p > 0,6$).

A frequência de micronúcleo em eritrócitos da circulação periférica apresentou-se em 44% de todos exemplares amostrados. A frequência foi significativa em 48% dos exemplares da primeira amostragem e em 40% da segunda.

Não foram consideradas significativas as diferenças entre as duas épocas de amostragem, quanto ao número de micronúcleos ($p > 0,6$).

Baseados nos resultados é fato de que existem agentes genotóxicos, ou um conjunto de agentes presentes no ambiente aquático estudado e que sua permanência neste ambiente vem atuando uniformemente em uma porção muito expressiva da população de *Astyanax bimaculatus*.

Para o efeito de genotoxicidade observado considera-se: toxinas liberadas por microalgas aquáticas; liberação de agentes químicos contidos na massa verde de macrófitas aquáticas; elevações no gradiente de concentração provenientes do tratamento de água utilizadas no abastecimento dos tanques; liberação de resíduos contidos na lona plástica que revestem os tanques experimentais; contaminação proveniente da alimentação externa;

Entre essas afirmações, a de maior probabilidade é a primeira, já que durante a pesquisa constatou-se uma forte presença de microalgas na lâmina superficial do ambiente em estudo.

Outro ponto conclusivo, é que, claramente não há relações diretas entre o número de elementos da série branca e a frequência de micronúcleos. Mais estudos

A metodologia utilizada neste trabalho para a retirada de alíquota sanguínea em *Astyanax bimaculatus*, para determinações hematológicas apresentou bons resultados, permitindo a execução da metodologia proposta, garantindo a sobrevivência dos exemplares, podendo ser recomendada, considerando aspectos conservacionistas e éticos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M.G.S.; REIS, S.R.A.; ROBINSON, W.M.; BORGES-OSÓRIO, M.R. Micronúcleo: Um Importante Marcador Biológico Intermediário na Prevenção do Câncer Bucal. **Revista Odonto Ciência** – Fac. Odonto/PUCRS, v. 20, n. 48, abr./jun. 2005 • 137.

BERTI, A. P. **Análise do Potencial Genotóxico da Água em Tanque de Cultivo, através do Teste de Micronúcleos, em *Astyanax bimaculatus***, 2007. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2007.

BRANDÃO, E. T. P. **Cianobactérias e Saúde Pública no Brasil**. 2008. 76f. Dissertação (Mestrado) - Biologia Humana e Ambiente. Universidade de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2008.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 1998.

FUJIMOTO, R. Y.; CRUZ, C.; MORAIS, F. R. Análise de Efluente e Histologia da Pele, Fígado e Rim de Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) Suplementados com Cromo Trivalente. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 117-124, 2008.

GRASSI, L.E.A. **Hematologia, Biometria, Teor de compostos organoclorados e Frequência de formação de micronúcleos em teleósteos de água doce, sob diferentes condições limnológicas**. 2002. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2002.

HOLDGATE, M. W. **A perspective of environmental pollution**. London: Cambridge University Press, 1979.

ISHIKAWA, N. M.; RANZINI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. Total leukocyte counts methods in fish, (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p. 54-63, 2008.

MAFRA-JUNIOR, L. L. **Microalgas Nocivas e Ficotoxinas no Complexo Estuarino de Paranaguá, PR: Subsídios para o Monitoramento**. 2005. 158f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O; JORDÃO, C. P. Absorção e Acúmulo de Cádmi e Seus Efeitos Sobre o Crescimento Relativo de Plantas de Aguapé e de Salvínea. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

RAMADE, F. **Ecotoxicologie Masson**. Paris: Masson, 1977. (Collection D'Ecologie, n. 22).

RANZANI – PAIVA, M. J. T. **Estudos hematológicos em curimatá, (Prochilodus Scrofa Steinder, 1981)Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae**. 1981. 119f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Instituto de Pesca d Coordenadoria de Recursos Naturais de Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1981.

_____. Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. L. A. P. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. p. 89-120.

RICHARD, F. C.; BOURG, A. C. M. Aqueous geochemistry of chromium: a review. **Water resources**, New York, v. 25, n. 7, p. 807-16, 1991.

RESENDE, S. M.; MACHADO, M. I. Ocorrências de Cianobactérias em Represas e Estações de Tratamento de Água no Abastecimento Público da Cidade de Uberlândia, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23., 2004. Campo Grande. **Anais eletrônicos...** Campo Grande: UFMS, 2004. Disponível em <<http://www.bvdse.paho.org/bvcsacd/abes23/VII-050.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2010.

ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces**. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 1981.

SCARPATO, R.; Migliore, L.; BARALE, R. The Micronucleus Assay in *Anodonta cygnea* for the Detection of Drinking Water Mutagenicity. **Mutation Research**, v. 245, p.231-237, 1990.

SCHIMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SINGH, G. et al. Xenobiotics Enhance Laccase Activity in Alkali-Tolerant Y-Proteobacterium Jb. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 26-30, 2009.

SOARES, E. P. et al. Caracterização de Polímeros e Determinação de Constituintes Inorgânicos em Embalagens Plásticas Metalizadas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 3, p. 206-212, 2002.

VAN DOLAH, F. M. Marine Algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 1, p. 133-141, 2000.