ANTÔNIO ERNESTO MEISTER LUZ MARQUES

COMPARAÇÃO ENTRE CONTAGENS DE ERITRÓCITOS PERIFÉRICOS PELO TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO EM *Astyanax fasciatus* SUBMETIDA À CONTAMINAÇÃO POR SULFATO DE COBRE

CURITIBA

2011

ANTÔNIO ERNESTO MEISTER LUZ MARQUES

COMPARAÇÃO ENTRE CONTAGENS DE ERITRÓCITOS PERIFÉRICOS PELO TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO EM *Astyanax fasciatus* SUBMETIDA À CONTAMINAÇÃO POR SULFATO DE COBRE

Monografia apresentada à disciplina BR016 – Estagio em Genética, como requisito à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof.ª Dra. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

À professora Drª. Marta Margarete Cestari, por toda a sua dedicação, incentivo e amizade nestes anos de trabalho no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental.

À mestranda Emanuele Cristina Pesenti, pela amizade, ajuda-auxílio e por todo o material cedido que, sem ele, não seria possível realizar este trabalho.

Aos membros da banca Professora Drª. Wanessa Algarte Ramsdorf e Msc. Laercio Dante Stein Piancini, que tanto me ensinaram desde o início no Laboratório.

À Profª. Drª. Marina Isabel Mateus de Almeida e a Doutoranda Gabrieli Limberger Galvan, pelo auxílio com as analises estatísticas.

A todos os meus colegas de laboratório do passado e do presente, Aurea, Gus, Kézia, Luiz, Paula, Rafael, Tati, Taynah, ..., que sempre ajudam nos momentos difíceis e alegram os momentos desgostosos.

À Camila da Costa Senkiv que além de todo amor, carinho e companheirismo transmitidos durante todos estes anos, sempre foi a minha melhor amiga.

Aos meus queridos amigos de graduação, Diego, Japa, Tiago, Pepino, Popó, Samuel, Luis, Vini, Jeff, Rui, Thalita, Joyce, Karin, Dani, Fer, Lu, e todos os outros que tornaram todos os anos de graduação muito mais divertidos e engraçados.

A todos os meus amigos de infância que sempre estão presentes quando precisamos.

À minha família, em especial, ao meu pai Paulo Fernando Luz Marques e mãe Regina Pettersen Meister Marques, por todo o apoio, carinho e dedicação durante toda uma vida.

“Time flies like an arrow; fruit flies like a banana.”

Groucho Marx

RESUMO

A poluição é dada tanto pelo lançamento de poluentes na atmosfera, como no solo e nos corpos d'água. Como a maior parte dos organismos vivos estão em ambiente aquático, deve-se evitar alterar o balanço natural e o ciclo dos metais por contaminação ambiental. Nestes ambientes devemos estudar os níveis de contaminação de cada metal para podermos estar sempre os controlando. O cobre é um metal essencial para a vida, mas em grandes quantidades pode causar distúrbios ao organismo. O cobre é muito utilizado através do Sulfato de Cobre ($CuSO_4$) como fungicida em cultivos frutíferos e algicida em pisciculturas. Para testar os efeitos da contaminação do Sulfato de Cobre foi feito um bioensaio por contaminação via hídrica semiestática por 168h na espécie *Astyanax fasciatus* em concentração de 0,039 mg/l de $CuSO_4$. Para análise genotóxica foi utilizado um grupo exposto e um grupo controle para o teste do Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas, onde foram testados quatro números de contagem: quinhentas, mil, duas mil e quatro mil células por animal (500, 1.000, 2.000 e 4.000 células/animal) para avaliar a eficiência e sensibilidade de cada contagem. A análise estatística utilizada foi o Teste de Kruskal-Wallis e o nível de significância foi 5% ($p<0,05$). Não foram encontrados resultados significativos sobre genotoxicidade do sulfato de cobre neste bioensaio. As contagens de 500, 1.000, 2.000 e 4.000 não apresentaram diferenças na comparação entre os grupos controle e exposto, porém esse resultado indica que quanto maior o número celular escorado maior fica a relevância estatística de cada tipo de alteração.

ABSTRACT

Pollution is caused by the emissions of pollutant in the atmosphere, soil and water. Most of organisms live in a water environment, and alterations on its natural balance and metal cycle must be avoid. On these environments, the levels of contamination of each metal should be studied, so it is possible to keep them under control. Copper is an essential metal for life, but if in bulk, can cause disorders to the organism. Copper is widely used through Copper Sulphate ($CuSO_4$), as fungicide in fruit crops and algaecide in pisciculture. To test the levels of contamination of Copper Sulphate, a bioassay was made by contamination by 168h semi-static water through *Astyanax fasciatus* in a concentration of CuSO4 of 0.039 mg/l. For genotoxic analysis, an exposed group and a control group were used for the piscine micronucleus and Morphological Changes tests. The test included four numbers for count: five hundred, one thousand, two thousand and four thousand cells per animal (500, 1.000, 2.000 and 4.000 cells/animal) to evaluate the efficiency e sensitivity of each count. For the statistical analysis, it was used the Kruskal-Wallis Test, and the level of significance was 5% ($p<0,05$). The results were not statistically significant for the genotoxicity of the copper sulfate on this bioassay. The counts 500, 1.000, 2.000 e 4.000 did not show difference in comparison between the exposed group and the control group. However, these results indicates that the higher the number of evaluated cells, the higher the statistical relevance of each type of alteration.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS III

RESUMO V

ABSTRACT VI

1. INTRODUÇÃO 8

1.1 O Ambiente Aquático 8

1.2 Bioindicador 9

1.3 Sulfato de Cobre 10

1.4 Biomarcador 11

2. OBJETIVOS 14

2.1 Objetivo Geral 14

2.2 Objetivos Específicos 14

3. MATERIAIS E MÉTODOS 15

3.1 Organismo utilizado 15

3.2 Coleta e aclimatação dos peixes 15

3.3 Tratamento dos animais 15

3.4 Obtenção do material 16

3.5 Teste do micronúcleo 16

3.6 Análise estatística 17

4. RESULTADOS 18

4.1 Medidas e Gênero Sexual 18

4.2 Avaliação do efeito tóxico da [ ] 0,039 mg/l de $CUSO_4$ 19

4.3 Avaliação das Contagens de 500, 1000, 2000 e 4000 Células 20

4.4 Avaliação das Diferentes Alterações Morfológicas 22

5. DISCUSSÃO 25

6. CONCLUSÃO 27

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 28

8. APÊNDICE 34

8.1 Tabelas das analises estatísticas. 34

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Ambiente Aquático

O ambiente aquático está exposto a processos de poluição causados pelas enormes variedade e quantidade de substâncias químicas que nele ingressam. Estas substâncias, que podem ser produzidas pelo homem ou de origem natural, são chamadas de “xenobióticos” e sua quantidade e variedade estão em contínuo aumento (LIVINGSTONE, 1993; 1998).

No entanto, a simples presença de um xenobiótico em um ecossistema aquático não pode, por si só, indicar um efeito deletério a este ecossistema. Conexões entre os níveis externos da exposição dos organismos com seus possíveis efeitos biológicos devem ser estabelecidas (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; HORI et al. 2008).

Estudos sobre a toxicidade de substâncias e elementos químicos se revestem de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo a esta contaminação, permitindo avaliar o impacto e o efeito sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (PADRANGI et al., 1995).

Apesar dos testes laboratoriais apresentarem dificuldades para com a extrapolação dos seus resultados ao ambiente, principalmente porque no ambiente aquático os contaminantes estão sujeitos a diversos processos bióticos e abióticos que não são reproduzidos em laboratório, estes testes são imprescindíveis para predizer possíveis efeitos tóxicos dos contaminantes no ambiente (COSTA et al. 2008).

Deve-se ressaltar que devido à variedade de possíveis efeitos de um xenobiótico, um teste isolado não é suficiente para avaliar a atuação deste sobre um ser vivo. Também se deve considerar que os efeitos encontrados podem ficar restritos a espécie, estudada bem como aos efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos com outras substâncias disponíveis no meio (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991 e FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2008).

Existem diferenças nas formas de metabolizar os xenobióticos, portanto, existe uma necessidade de se detectar e avaliar o impacto de poluentes nos organismos expostos, e não somente avaliar a quantidade de poluentes presentes

no ambiente e nos animais. Um bom método para se estudar os efeitos tóxicos no ambiente é através de um bioindicador (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003)

1.2 Bioindicador

Bioindicador é definido como um organismo que fornece informações sobre condições do seu habitat, que pode ser tanto pela sua presença, ausência e ou pelo seu comportamento (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Um dos melhores indicadores ambientais que existem são os peixes. Eles podem ser utilizados amplamente para monitorar o ambiente por apresentarem uma resposta a agentes xenobióticos muito similar a dos grandes vertebrados. Os peixes também são um dos maiores vetores de contaminantes para seres humanos, pois estão intimamente relacionados aos nossos hábitos alimentares. Peixes também podem ser indicadores do potencial de exposição a tóxicos químicos (AL-SABTI, METCALFE, 1995).

A utilização de peixes como indicadores para efeitos da poluição é cada vez mais importante e pode permitir a detecção de problemas ambientais aquáticos de forma precoce (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os bioindicadores também podem ser usados nas avaliações de risco, porque apresentam vantagem de possibilitar a detecção de exposições potencialmente tóxicas bem antes que efeitos adversos maiores ocorram (NASCIMENTO; PEREIRA; LEITE, 2008; PROSPÉRI; NASCIMENTO, 2008).

O gênero *Astyanax* (Baird & Girrard, 1854), com peixes conhecidos por lambari ou piabas, é um dos mais ricos em espécies dentro da família Characidae, a mais complexa e numerosa da Ordem Characiformes, ocorrendo desde o sul dos Estrados Unidos até a Argentina (OYAKAWA *et al*., 2006). *Astyanax fasciatus* (CURRER, 1819) é uma espécie exclusivamente de água doce, bentopelágica e de ampla distribuição, ocorrendo entre México e Argentina. Araújo (1998) e Menni et al. (1996) classificam o *A. fasciatus* como relativamente tolerante a degradação ambiental, sendo que esta é uma característica necessária em uma espécie bioindicadora.

Schulz e Martins-Junior (2001) recomendam o uso do *A. fasciatus* em estudos de monitoramento biológico por ser uma espécie comum, de fácil captura e que apresenta sistemas suficientemente sensíveis.

1.3 Sulfato de Cobre

Sabe-se que metais são naturalmente incorporados aos ecossistemas aquáticos por meio de processos geoquímicos. No entanto, nas ultimamente, têm se observado inúmeras alterações ambientais provenientes, em sua maioria, dos processos de urbanização e industrialização (RODRIGUEZ, 1998).

A poluição por agrotóxicos e metais aumentou em consequência da sua grande utilização pela agroindústria. No Brasil essa atividade é responsável por boa parte da balança comercial. Para garantir essa atividade, pequenos e grandes produtores utilizam produtos químicos para maximizar as suas produções (KUBITZA, 1999).

Os metais de transição (cobre, zinco, ferro, cobalto, manganês) tem grande significado biológico e são importantes ao bom funcionamento dos organismos, nos quais desempenham valiosas funções. Esses metais interagem com muitos tipos celulares e, assim, desempenham importante papel na respiração celular, no transporte de oxigênio, na estabilidade protéica, entre outros. Entretanto, em excesso tornam-se tóxicos, pois se ligam inapropriadamente a moléculas ou formam radicais livres. Altas concentrações de cobre também afetam a função branquial por meio da perturbação da homeostase do sódio (LAURÉN & McDONALD, 1985).

O sulfato de cobre ($CuSO_4$) é o mais conhecido e mais utilizado entre os sais de cobre, sendo principalmente utilizado na agricultura como fungicida para cultura frutífera (YADAV & TRIVEDI, 2009a). O sulfato de cobre também é utilizado em pisciculturas por ser um algicida, assim atuando na redução da floração de algas que pelo consumo excessivo de O_2 pode levar a um declínio dos níveis desse gás para os demais organismos aquáticos. É também utilizado terapeuticamente para a diminuição da incidência de endoparasitas em espécies cultivadas (SCHELENK et al. 1998).

A aplicação usual de sulfato de cobre na piscicultura varia de 0,025 a 2,00 mg/l; contudo, a administração desse produto nem sempre é efetuada de forma controlada, sendo que seu uso indiscriminado, mesmo de forma profilática, pode trazer consequências gravíssimas ao meio ambiente (BOYD, 1990).

De acordo com a resolução Nº 357 do CONAMA, de 17 de março de 2005, o valor máximo de cobre dissolvido permitido para águas doces classe III (destinadas

ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado) é de 0,013 mg/L Cu.

Quando o cobre é empregado indevidamente, pode apresentar efeitos tóxicos nas espécies aquáticas (BEAUMONT, 2000; BUTLER & TAYLOR, 2000; STRAUS, 2003). As substâncias tóxicas tendem a inibir ou acelerar o metabolismo (DANG, 2000), sendo que esses efeitos se iniciam primeiramente nas células e podem alterar a permeabilidade de membranas (NRIAGU & PACINA, 1998), afetando a integridade celular, tanto estrutural quanto fisiologicamente, resultando em lesões histopatológicas e levando ao comprometimento da função de um ou mais órgãos (HEATH, 1995).

Prá *et al*. (2006) ressaltam os resultados de um estudo que aponta o efeito tóxico e genotóxico do sulfato de cobre em planárias de água doce (*Girardia schubarti*) e em camundongos (*Mus musculus*). O efeito genotóxico pode ser atribuído à indução de EROs (espécies reativas de oxigênio), que pode causar danos em componentes celulares, como DNA e proteínas.

1.4 Biomarcador

Os biomarcadores são respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensurados indicando a presença, efeitos e, em alguns casos, o grau de contaminação (WALKER et al., 1996). O teste do micronúcleo que é muito utilizado para avaliação genotóxica de agentes xenobióticos em situações ambientais e laboratoriais.

Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática que parecem com pequenos núcleos surgindo a partir de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos intactos atrasados na fase de anáfase da divisão celular, assim diz-se que a presença do micronúcleo na célula é diretamente ligada às aberrações que ocorrem durante a mitose (ÇAVAS, ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

São considerados micronúcleos aqueles que são formados e estão visivelmente separados do núcleo principal da célula possuindo um tamanho que corresponde de 1/5 a 1/20 do tamanho deste núcleo e ainda que não ultrapassem em 1/3 o tamanho do núcleo principal. Devem ainda possuir bordas e a mesma refringência do núcleo principal. No caso específico de peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, esta proporção passa para 1/10 a 1/30 do

tamanho do núcleo (AL-SABIT, METCALFE. 1995; AYLLON, GARCIA-VAZQUEZ. 2000; GUSTAVINO et al., 2001).

O teste do Micronúcleo é utilizado como passo inicial para estudar substâncias mutagênicas. Considerado um teste rápido e sensível para a detecção de alterações cromossômicas estruturais quanto numéricas (HEDDLE et al., 1983).

Apesar da maior parte dos estudos que utilizam o teste do micronúcleo ter sido conduzido em mamíferos, especialmente em roedores, o mesmo tem se mostrado eficiente quando extrapolado à outros animais. No ambiente aquático, o teste possibilita detectar propriedades genotóxicas de compostos presentes no ambiente através de estudos com peixes que, aparentemente, respondem a xenobióticos da mesma maneira que mamíferos, podendo assim, ser empregados com a finalidade de testar possíveis propriedades genotóxicas de agentes químicos e físicos (UDROIU, 2006).

Atualmente, estudos descrevem a presença de anormalidades eritrocitárias nucleares (AENs), além do micronúcleo, em células de peixes expostas a substâncias genotóxicas (AYLLON, GARCIA-VAZQUES. 2000; ÇAVAS, ERGENE-GÖZÜKARA, 2005), sendo que, nos últimos anos, a expressão simultânea de anormalidades nucleares juntamente com micronúcleos recebeu uma atenção considerável. Embora os mecanismos responsáveis pela formação das AENs ainda não tenha sido descrito, muitos estudos indicam que elas sejam induzidas por resposta a agentes genotóxicos (TOLBERT et al., 1992; SERRANO-GARCIA, MONTERO-MONTOYA, 2001).

As alterações podem ser classificadas segundo CARRASCO et al., (1990), como:

a) *Blebbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. O tamanho destas evaginações se situa na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas que as descritas para os Blebbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.

c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Esses vacúolos se mostram destituídos de qualquer material nuclear visível no seu interior.
d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envelope nuclear.
e) *Binucleo*: classificada segundo FENECH et al., (2003).

Como fica evidenciado, apesar do teste de micronúcleo ser bem estabelecido em camundongos, em peixes muitos aspectos deste protocolo necessitam de um refinamento. O conhecimento de fatores como a duração do ciclo dos eritroblastos, o tempo requerido para sua maturação e aparecimento na circulação e seu tempo de vida devem ser considerados. Deve-se salientar que o rim cefálico é o principal, mas não o único órgão hematopoiético dos peixes. O sangue circulante recebe eritrócitos de vários órgãos hematopoiéticos e consequentemente eventuais eritrócitos com micronúcleos não originados a partir do rim cefálico. Além destes fatores, também devem ser consideradas as diferenças interespecíficas e, desta forma, novos ensaios com peixes devem ser realizados (UDROIU, 2006).

Outro aspecto que necessita de uma padronização é o escore do número celular suficiente para este teste. O número de células analisadas por lâmina varia muito, alguns autores leem 1.000 células (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; OSMAN et al. 2010 e YADAV; TRIVEDI, 2009b), outros 2.000 células (Al SABTI; METCALFE, 1995; ÇAVAS; KÖNEN, 2008; LEMOS et al. 2008), outros leem 4.000 (BOLOGNESI et al. 2006; FERRARO et al. 2004) e ainda há quem leia 10.000 células por lâmina (MINISSI; CICCOTTI; RIZZONI, 1996). Por isso é necessário que seja pesquisado um número ideal de células a serem analisadas no teste do micronúcleo em peixes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar dentre 500, 1.000, 2.000 e 4.000 eritrócitos, qual destes é mais recomendado para o teste do micronúcleo písceo a fim de avaliar genotoxicidade em *Astyanax fasciatus* submetidos à contaminação por sulfato de cobre.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar se a concentração de 0,013 mg/l de cobre (0,039 mg/l de sulfato de cobre) em 168 horas de exposição semiestática, pode ser considerada genotóxica para *Astyanax fasciatus,* através do teste de micronúcleo písceo

Comparar as contagens de eritrócitos periféricos no teste do micronúcleo písceo, analisando 500, 1000, 2000 e 4000 células por animal nos grupos controle e exposto ao sulfato de cobre por 168h.

Verificar se existe preferência de algum tipo de alteração nuclear na espécie *Astyanax fasciatus* submetida à exposição por 168 horas ao sulfato de cobre (0,039 mg/l).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Organismo utilizado

Foram utilizados peixes da espécie *Astyanax fasciatus* (Lambari) (figura 1), obtidos a partir de piscicultores comerciais. As pisciculturas não apresentam histórico de contaminação ou fontes próximas capazes de fazê-la.

Figura 1: Foto *Astyanax fasciatus*. A barra de escala corresponde a 3,2 cm. Shibatta e Artoni, (2005).

3.2 Coleta e aclimatação dos peixes

Depois da aquisição dos peixes, eles foram aclimatados por 30 dias em um tanque de 250 litros de polietileno. A alimentação consistiu de ração comercial fornecida a cada 24 horas, respeitando a condição de não alimentar os animais 24 horas antes da coleta de material. O tanque teve a temperatura e a aeração controladas, bem como o regime de iluminação com 12 horas claro e 12 horas escuro.

3.3 Tratamento dos animais

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioensaios em Mutagênese Ambiental no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Passado os 30 dias de aclimatação, os animais (n=15) do grupo exposto foram expostos por 168 horas (7 dias) à 0,039 mg/l de sulfato de cobre (equivalente a 0,013mg/l de cobre dissolvido), via hídrica. O ensaio compreendeu o sistema

semiestático de contaminação, pois a cada 24 horas (2 horas após a alimentação), 1/3 da água do tanque era renovada completando esse volume com a concentração do agente xenobiótico proporcional ao volume retirado. No grupo controle negativo (n=14) os animais foram tratados de forma semiestática sem o uso do xenobionte.

3.4 Obtenção do material

Após o período de duração do bioensaio, os peixes foram anestesiados com solução alcoólica com 10% de Benzocaína diluída em uma proporção de 10 ml da solução para cada 1 litro de água, o sangue foi retirado por punção cardíaca com capilar heparinizado. Imediatamente o sangue foi gotejado sobre uma lâmina limpa e realizada a extensão do material com auxílio de uma lamínula para o teste do micronúcleo.

3.5 Teste do micronúcleo

Para verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por (HEDDLE, 1973) e (SCHMID, 1975), com algumas modificações.

A técnica aplicada consistiu das etapas:

a) As lâminas foram bem limpas e identificadas.

b) Ao coletar o sangue do peixe, uma gota foi colocada na superfície da lâmina.

c) Com o auxílio de uma lamínula, foi feito um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina (técnica de extensões sanguíneas).

d) Foi confeccionada uma lâmina por peixe.

e) As lâminas, após secarem ao ar, foram fixadas em etanol 100% por 15 minutos em cubetas.

f) As lâminas foram coradas com Giemsa 5% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 12 minutos e em seguida lavadas com água destilada.

g) Foram analisadas 500, 1.000, 2.000, 4.000 células em diferentes contagens para cada peixe (teste cego), ou seja, para cada peixe foram analisados 500 eritrócitos até terminar os grupos. Após esta análise foram realizadas aquelas de 1.000 eritrócitos e assim sucessivamente. Foram consideradas nas análises hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intactas.

3.6 Análise estatística

O teste de Kruskal Wallis para dados não paramétricos foi empregado para verificar diferenças entre os dois grupos analisados (controle e exposto) e entre o número celular de cada análise, com um nível de significância considerado nas análises menor do que 0,05 ($p < 0,05$ ou $p < 5\%$).

4. RESULTADOS

4.1 Medidas e Gênero Sexual

No experimento realizados os animais utilizados apresentaram os seguintes resultados para comprimento total e parcial, peso e sexo dos grupos controle e exposto (Tabela 1 e 2), não houve mortalidade durante o experimento.

23/05/2011 168 horas de contaminação	**Tamanho - comprimento total (CT) e comprimento parcial (CP)**			
	CT	**CP**	**Peso (gramas)**	**Sexo**
animal 1	5,9	4,9	1,68	♀
animal 2	6,0	4,8	1,62	♀
animal 3	5,7	4,6	1,64	♀
animal 4	5,2	4,2	1,12	♀
animal 5	5,3	4,5	1,37	♀
animal 6	5,9	4,2	1,29	♀
animal 7	5,8	4,7	1,51	♂
animal 8	5,4	4,5	1,48	♀
animal 9	5,8	4,6	1,50	♂
animal 10	4,6	3,8	0,90	♀
animal 11	5,0	4,1	1,05	♀
animal 12	5,2	4,0	1,10	♀
animal 13	5,4	4,4	1,35	♂
animal 14	5,4	4,3	1,23	♂
animal 15	5,4	4,3	1,25	♀

Tabela 1: Resultados referentes ao tamanho dos animais, peso e sexo

23/06/2011 – controle negativo	**Tamanho - comprimento total (CT) e comprimento parcial (CP)**			
	CT	**CP**	**Peso (gramas)**	**Sexo**
animal 1	6,4	5,2	2,10	♂
animal 2	5,8	4,7	1,59	♂
animal 3	5,7	4,8	1,80	♀
animal 4	5,5	4,4	1,50	♂
animal 5	5,7	4,7	1,64	♀
animal 6	5,8	4,6	1,60	♂
animal 7	5,4	4,4	1,27	♂
animal 8	7,0	5,6	2,59	♀
animal 9	5,6	4,6	1,44	♂
animal 10	6,4	4,8	2,15	♀
animal 11	5,7	4,6	1,33	♂
animal 12	5,4	4,3	1,28	♀
animal 13	4,9	4,1	1,09	♀
animal 14	5,2	4,3	1,28	♂

Tabela 2: Resultados referentes ao tamanho dos animais, peso e sexo

4.2 Avaliação do efeito tóxico da [ ] 0,039 mg/l de $CUSO_4$

Para que as contagens pudessem ser comparadas entre si, foi feita uma transformação para porcentagem (%) de alterações morfológicas nucleares (AMN). Deste modo os resultados obtidos nas contagens puderam ser comparados possibilitando uma avaliação estatística entre as contagens.

Para o Teste do micronúcleo písceo no Grupo Controle, ao se comparar as análises de eritrócitos (500, 1.000, 2.000 e 4.000), não foi detectada diferença significativa (H=1,5577; Graus de Liberdade 3 e p = 0,6690). No Grupo Exposto também não foi detectada diferença entre as análises de eritrócitos (500, 1.000, 2.000 e 4.000) (H=0,6108; Graus de Liberdade 3 e p = 0,8940) (figura 2).

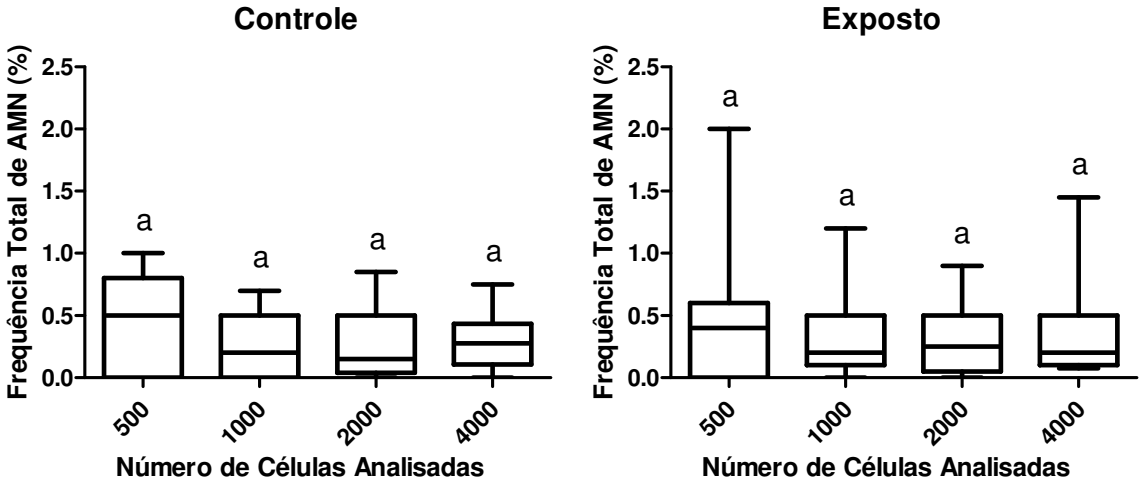

Figura 2: Gráfico mostrando a igualdade na comparação de contagens no grupo controle e exposto (letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos).

Ao se comparar o grupo controle com o grupo exposto (figura 3) não foi detectada diferença entre eles, mesmo quando comparadas as contagens entre si.

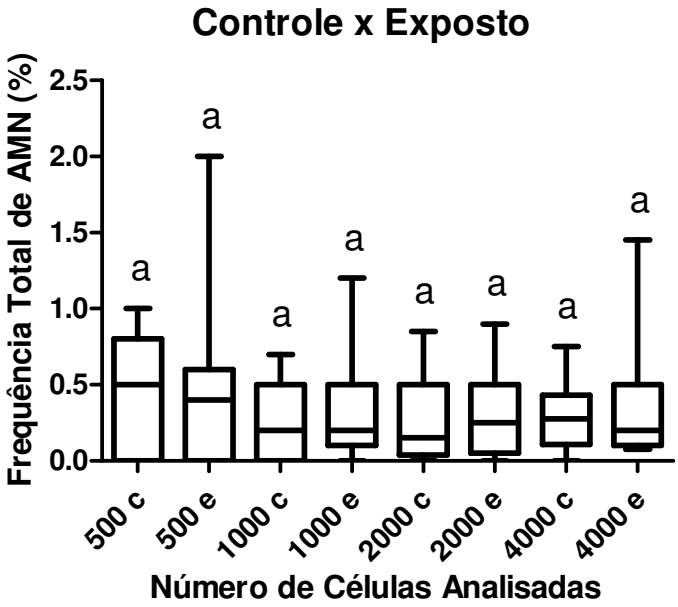

Figura 3: Gráfico mostrando a igualdade entre a comparação de todos os grupos controle (c) e exposto (e) (letras iguais indicam semelhança estatística).

4.3 Avaliação das Contagens de 500, 1000, 2000 e 4000 Células

O resultado das comparações entre alterações no grupo controle e exposto discriminando as análises de 500, 1000, 2000 e 4000 células eritrocitárias, bem como as alterações divididas em Micronúcleo (MN), Blebbed, Lobed, Notched, Binucleos e Vacuolated.

Quando comparadas as diferentes formas de alterações morfológicas nucleares e quantidade de micronúcleos (MN) com relação às diferentes contagens de eritrócitos, observamos que para 500, 1000 e 2000 células analisadas no grupo controle a alteração Notched se destaca significativa com relação às outras alterações, mas quando comparadas as diferentes formas de alterações morfológicas nucleares e quantidade de MN com na análise de 4.000 eritrócitos por peixe, observamos que, no grupo controle, a alteração Notched continuou com a maior frequência em relação às demais alterações, havendo, também, diferença das formas Blebbed e Vacuolated que foram semelhantes entre si e diferente das demais alterações (figura 4).

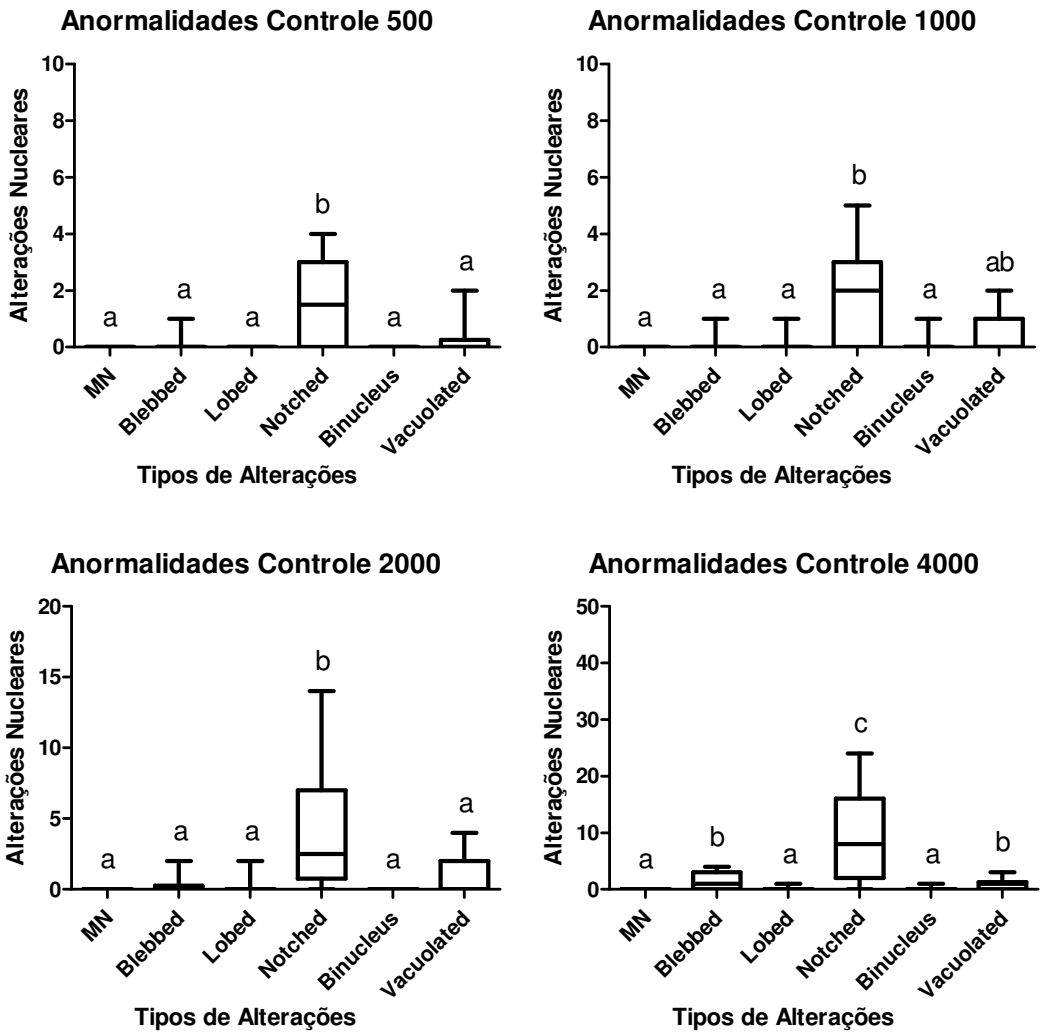

Figura 4: Gráficos mostrando o número de alterações encontradas em cada uma das análises no grupo controle (letras iguais indicam semelhança estatística e letras diferentes indicam diferença entre os grupos).

Quando comparadas as diferentes formas de alterações morfológicas nucleares e quantidade de micronúcleos (MN) com relação às diferentes contagens de eritrócitos, observamos que para 1000 e 2000 células analisadas no grupo exposto a alteração Notched se destaca significativa com relação às outras alterações. Ao comparar as diferentes formas de alterações morfológicas nucleares e quantidade de MN na análise de 4.000 eritrócitos por peixe, observamos que, no grupo controle, a alteração Notched também apresentou a maior frequência em relação às demais alterações, havendo, também, diferença da forma Blebbed em relação às outras alterações (figura 5).

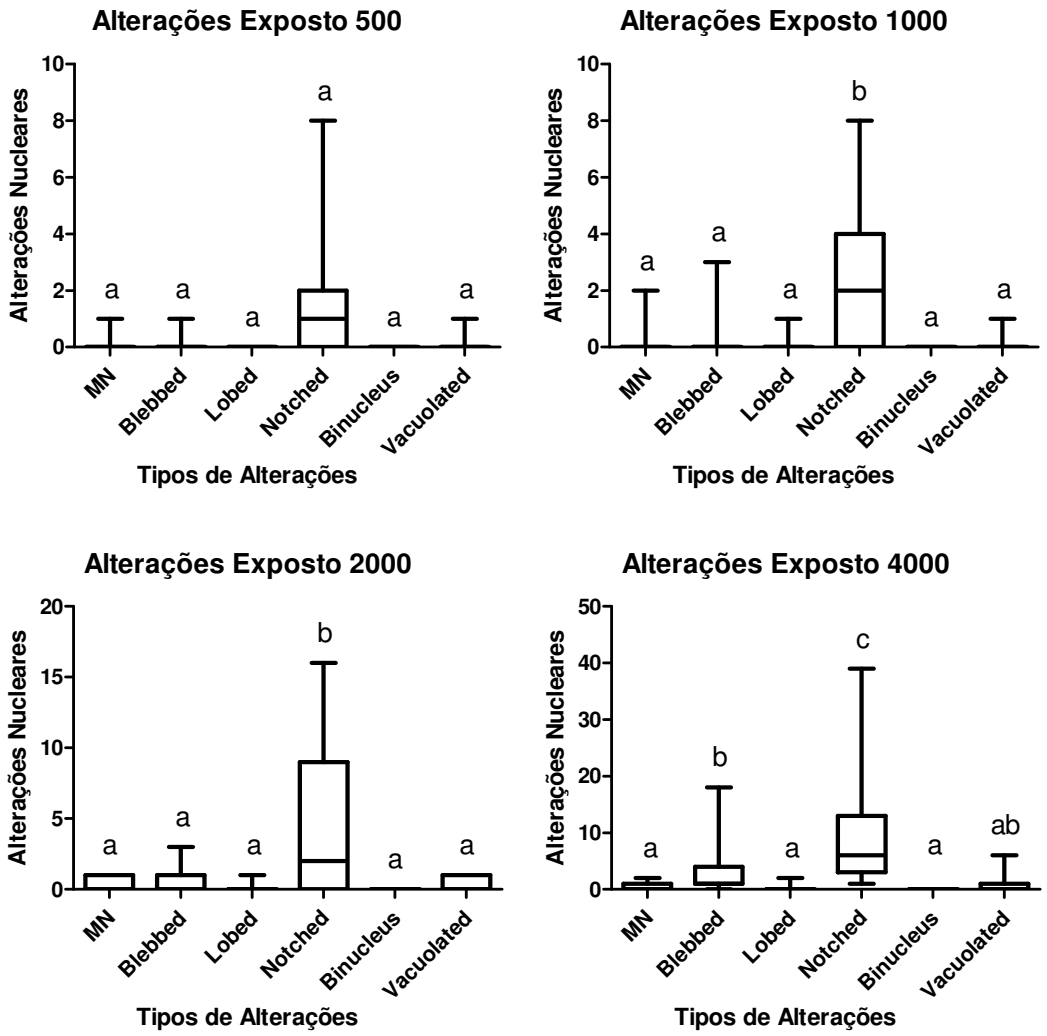

Figura 5: Gráficos mostrando o número de alterações encontradas em cada uma das análises no grupo exposto (letras iguais indicam semelhança estatística e letras diferentes indicam diferença entre os grupos).

4.4 Avaliação das Diferentes Alterações Morfológicas

Ao compararmos as frequências de alterações entre as contagens foi observado que a alteração do tipo Blebbed apresenta diferença na contagem de 4.000 células, tanto no grupo controle quanto no grupo exposto.

As demais formas de alterações não apresentaram diferenças entre as contagens. No grupo controle não foi encontrada nenhum Micronúcleo e no grupo exposto não foi encontrada nenhuma alteração do tipo Binucleus.

As figuras 6 e 7 mostram as frequências de alterações encontradas para cada contagem realizada separadamente. A figura 8 mostra alguns tipos de alterações encontradas durante as análises.

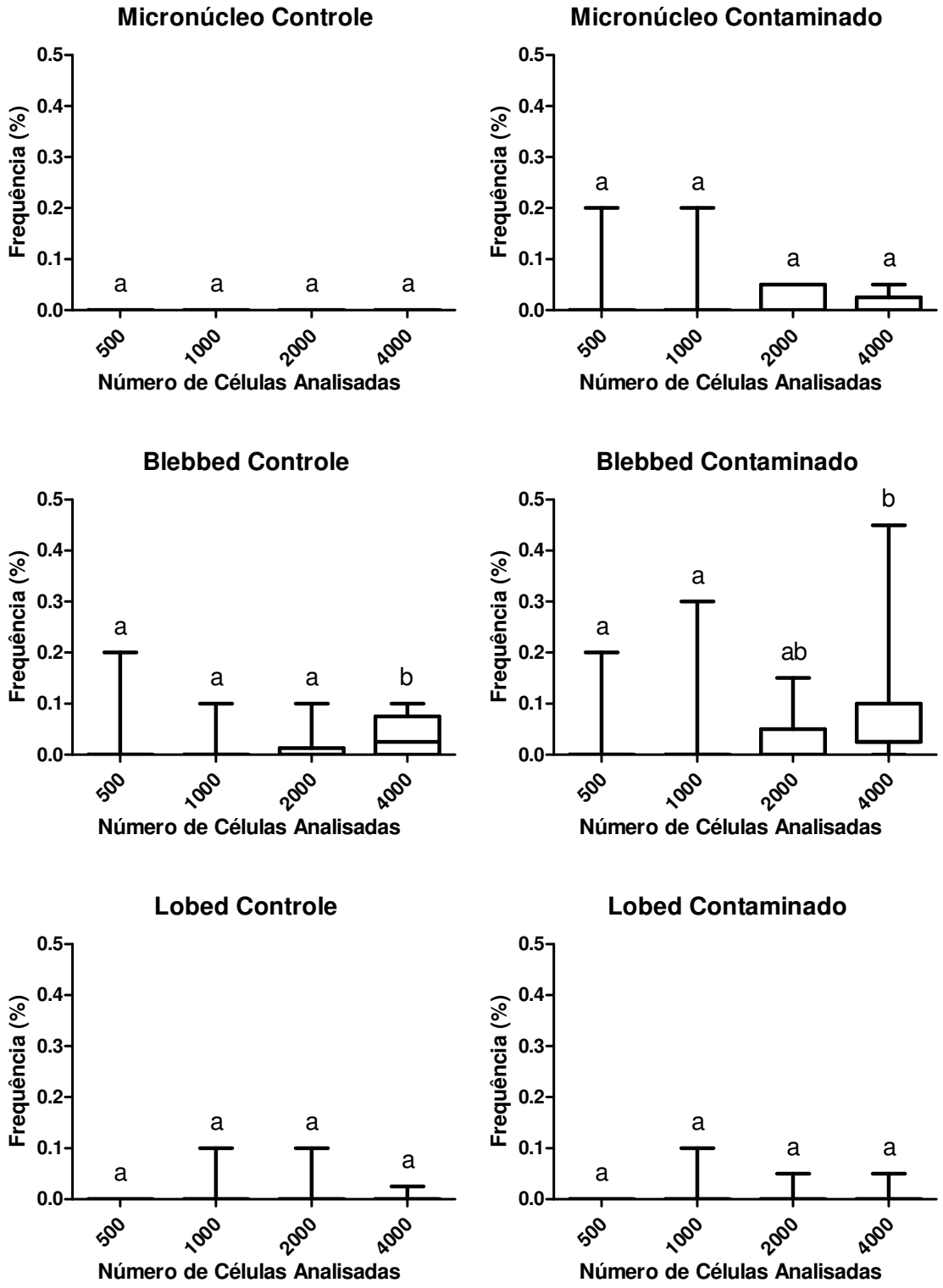

Figura 6: Gráfico da frequência de alterações encontradas nas diferentes análises do grupo controle e exposto (letras iguais indicam semelhança estatística e letras diferentes indicam diferença entre as análises).

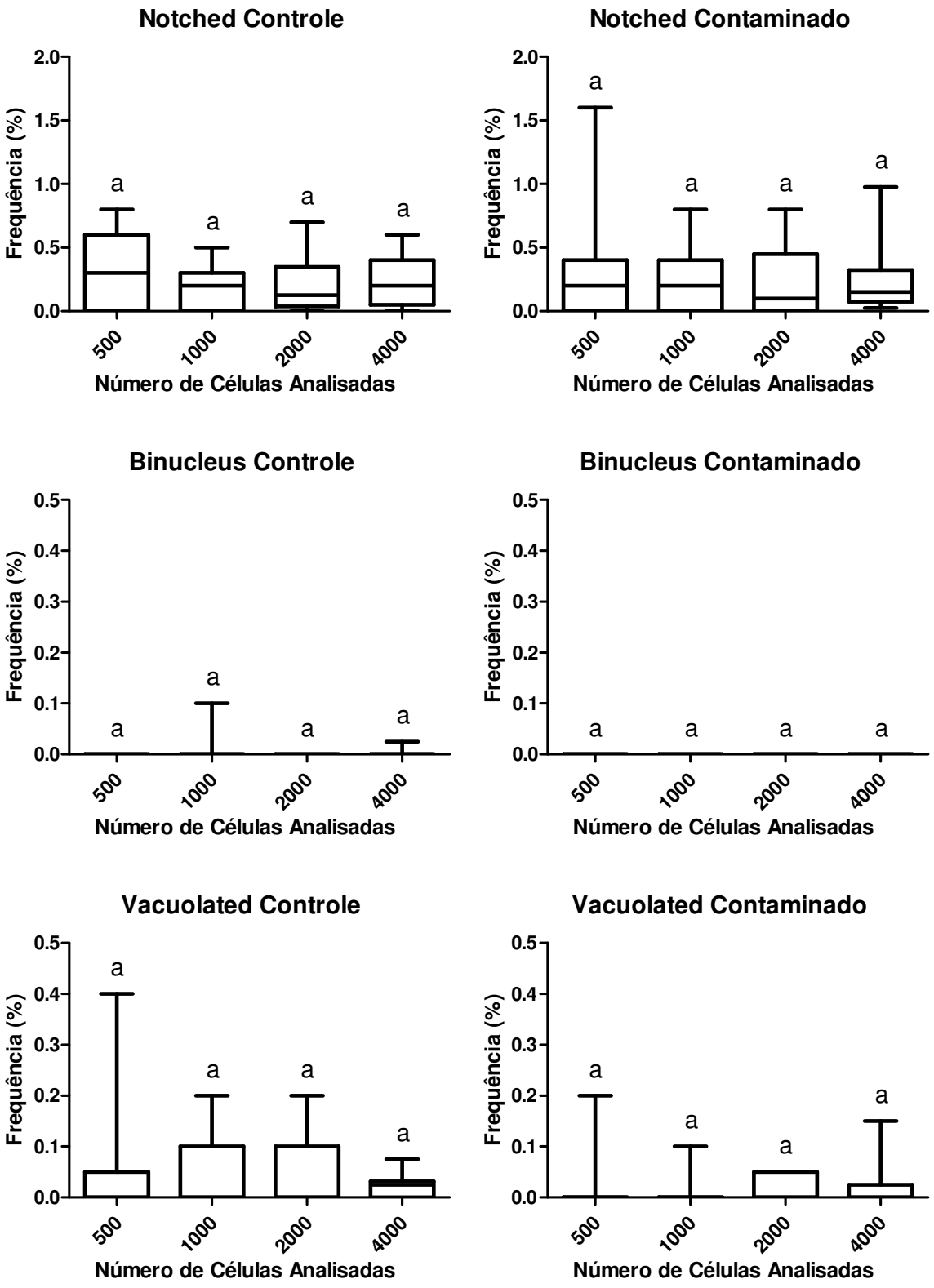

Figura 7: Gráfico da frequência de alterações encontradas nas diferentes análises do grupo controle e exposto (letras iguais indicam semelhança estatística e letras diferentes indicam diferença entre as análises).

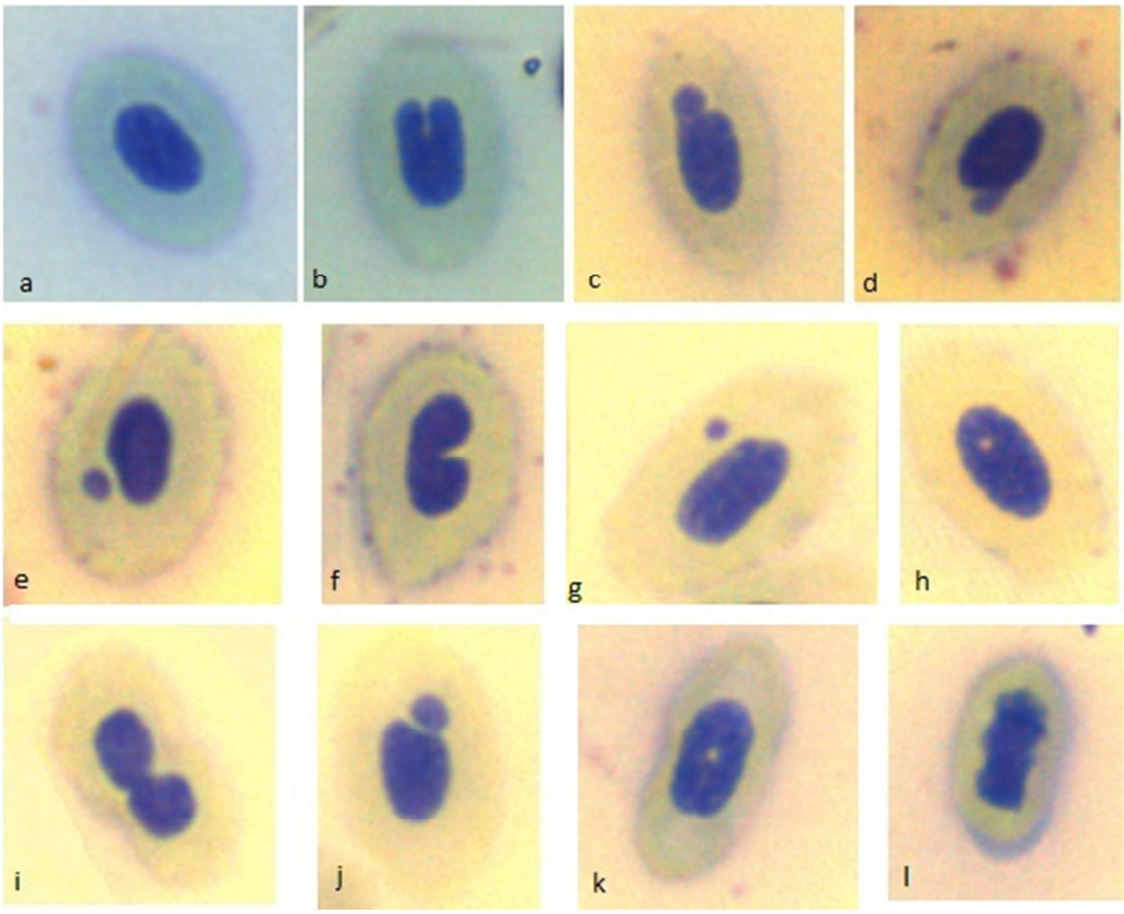

Figura 8: Foto montagem mostrando uma célula normal (a), Blebbed (c, d), Micronúcleo (e, g, j), Vacuolated (h, k), Notched (b, f, i) e Lobed (l).

Fonte: O Autor (2011).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho o sulfato de cobre não apresentou diferença no teste do micronúcleo, embora, Ramsdorf (2007), utilizando o sulfato de cobre em uma concentração de 0,25 mg/l com exposição de 72 horas em *Astyanax sp B*, o grupo exposto apresentou diferença nos dois testes utilizados (teste do micronúcleo e ensaio cometa), demosntrando a genotoxicidade do cobre.

Em estudo semelhante utilizando a espécie *Rhamdia quelen* (jundiá), Ghisi et al. (2011), analisou 1.000, 2.000, 3.000 e 4.000 eritrócitos para verificar se existia diferença entre as contagens de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares totais, mas acabou não encontrando diferença entre as contagens, sugerindo desta

forma que contabilizar apenas mil células seria o suficiente para se obter resultados satisfatórios neste teste.

Neste trabalho foram analisadas 500, 1.000, 2.000 e 4.000 células no teste do micronúcleo e alterações morfológicas nucleares, não havendo diferença entre as contagens ao considerar apenas o total de alterações morfológicas nucleares de cada grupo.

Neste trabalho, podemos verificar que as diferenças apareceram quando as alterações foram verificadas separadamente, na medida em que o número amostral celular aumentava também havia uma representação maior das diferenças entre cada tipo de alteração, podendo, assim separá-las pelas suas frequências totais. Deste modo ficou evidenciado que quanto maior o número contabilizado melhor é a caracterização das frequências de cada alteração.

Quando foram comparadas as frequências de alterações dentro dos grupos a alteração Blebbed (segunda alteração mais encontrada) apresentou diferença na sua frequência quando analisadas 4.000 células reforçando que contagens maiores apresentam diferenças em relação as menores contagens.

Contudo pode ser indicada a utilização da menor contagem em casos onde o número celular disponível seja inferior a um milhar. Este fato pode ocorrer quando é apresentada alguma dificuldade na obtenção de material e confecção das lâminas. Assim, quando considerado o número total de alterações, podemos utilizar uma contagem de 500 células/lâmina e a contagem será ser eficiente neste caso.

Nas contagens realizadas o grupo exposto não apresentou diferença em relação ao grupo controle, embora Yadav & Trivedi (2009a) mostram o potencial genotóxico do sulfato de cobre pentahidratado (0,407 mg/L) na espécie de peixe *Channa punctata*, mesmo em concentrações subletais, através dos testes de aberrações cromossômicas e micronúcleo em períodos de exposição ao metal de 24, 48, 72, 96 e 168 horas.

A ausência de diferença entre os grupos controle e exposto em nosso trabalho pode estar relacionada com a dinâmica hematológica da espécie utilizada. Como a formação das alterações ocorre preferencialmente no tecido renal e em média tem uma duração de três meses, o tempo de contaminação pode não ter sido suficiente para demonstrar uma possível toxicidade do cobre, assim como os eritrócitos alterados também terem sido retirados de circulação.

Outra possibilidade para a ausência da observação de efeito genotóxico do cobre é o fato de que o cobre é um metal essencial entre os seres vivos e existe uma coevolução com esse metal, que está muito presente na crosta terrestre. Com isso uma baixa dose do metal não traria um grande efeito sobre o organismo porque este já está preparado para conviver com certas doses deste metal.

Entre tanto não podemos deixar de destacar que o teste de micronúcleo písceo, em muitos trabalhos realizados com eritrócitos de peixes contaminados com metais não foi sensível a ponto de demonstrar a genotoxicidades dos xenobióticos testados, (RAMSDORF et al, 2008) utilizando sulfato de cobre e (FERRARO, 2003) utilizando chumbo. O teste do MN não apresentou efeito enquanto ensaios tidos como mais sensíveis (como o Ensaio Cometa) mostraram efeito genotóxico.

Acredito desta forma que outro biomarcador precoce, como o Ensaio Cometa, pode demonstrar a genotoxicidade deste agente xenobiótico por ser mais sensível do que o teste do micronúcleo písceo.

6. CONCLUSÃO

As contagens foram realizadas nos grupos controle e exposto (sulfato de cobre 0,039 mg/l) e não houve diferença entre os grupos dentro de cada uma das contagens.

Na avaliação do sulfato de cobre (0,039mg/l) foi verificado que não houve alterações suficientes para indicar genotoxicidade.

Neste trabalho foram realizadas 4 análises de células eritrocitárias que foram em número de 500, 1.000, 2.000 e 4.000 a fim de avaliar e tentar demonstrar qual destas contagens seria mais indicada para o teste do Micronúcleo Písceo. A contagem inicial de 500 células neste trabalho se mostrou eficiente para avaliar o total de alterações encontradas dentro de cada grupo, sendo seus resultados iguais às das contagens de mil, duas mil e quatro mil células para MN e alterações nucleares totais.

Na avaliação das alterações morfológicas nucleares não foi possível distinguir um tipo de alteração preferencial causada pela contaminação do sulfato de cobre, mesmo nas diferentes contagens realizadas.

Porém pode-se observar que na medida em que o número de células contadas aumenta, observam-se diferenças entre as mal formações nucleares que ficam ocultadas nas contagens mais baixas.

Na avaliação das frequências das alterações morfológicas, Blebbed foi a alteração que apresentou diferença entre as contagens, sendo esta a segunda alteração mais encontrada nas análises.

A alteração morfológica nuclear Notched foi a que se apresentou significativa em todas as contagens em eritrócitos de *Astyanax fasciatus.*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K.; METCALFE,C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **MutationResearch**, v.343, p. 121-135, 1995.

ARAÚJO, F. G., 1998, Adaptação do índice de integridadebiótica usando a comunidade de peixes para o Rio Paraíbado Sul. **Rev. Brasil. Biol**., v 58(4): p 547-558.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinusphoxinus* and *Poecilialatipinna*, an assessment of the fish micronucleus test. **MutationResearch**, v. 467, p. 177-186, 2000.

BEAUMONT, M.W.; BUTLER, P.J.; TAYLOR, E.W. Exposure of brown trout, *Salmotrutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. **Aquatic Toxicol.**vol.51, p. 259-272, 2000.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology,** v.78, p.93–98, 2006.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 482 páginas,1990.
CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.R.C. Jundiá, um grande peixe para a Região Sul. **Panorama da Aquicultura**, v.12, p. 41-46, 2002.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as na in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish.Sci.**, Ottawa, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CONAMA (2005) – Conselho Nacional do Meio Ambiente / Ministério do Meio ambiente. **Resolução Nº 357** de 17 de março de 2005.

COSTA, CARLA REGINA; OLIVI, PAULO; BOTTA, CLARICE M. R; ESPINDOLA, EVALDO L. G.A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova** v. 31, p. 1820-1830, 2008.

ÇAVAS, T. S. ERGENE-GÖZÜKARA. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **AquaticToxicology**, v. 74, p. 264–271, 2005.

ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. In vivo Genotoxicity Testing of the Amnesic Shellfish Poison (Domoic Acid) in Piscine Erythrocytes Using the Micronucleus Test and the Comet Assay. **AquaticToxicology**, v.90, p. 154-159, 2008.

DANG, Z. **Adaptative stress responses in fish gills.** PhD Thesis. University of Nijmegen, Nijmegen, Netherlands, 2000.

FENECH, M; Chang, W.P; Kirsch-Volders, M; Holland, N; Bonassi, S; Zeiger, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** v 534, p 65-75, 2003.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação do Efeito Mutagênico do Tributilestanho (Tbt) e do Chumbo Inorgânico (Pb Ii) em *Hoplias Malabaricus* (Pisces) Através dos Ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas.** Dissertação (Mestrado em Genética), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003

FERRARO, M. V. M; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; CESTARI, M. M.; RIBEIRO, C. A. O. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus*as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleous and Chromosome Aberrations tests. **Geneticsand Molecular Biology**, v. 27, nº1, p.103-107, 2004.

FRENZILI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet Assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research –Reviews in Mutation Research.** Article in press (MUTREV-7886), 13p.(2008).

GHISI N. C;WANESSA ALGARTE RAMSDORF; MARCOS VINÍCIUS MOCELLIN FERRARO; MARINA ISABEL MATEUS DE ALMEIDA; CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO; MARTA MARGARETE CESTARI. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil.**EnvironMonitAssess,** v. 180, p. 589–599, 2011.

GOMES L.C. GOLOMBIESKI, J.L.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (teleostei, Pimelodidae) – Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GUSTAVINO, B.; SCORNAJENGHI, K. A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicines. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 494, p. 151-159, 2001.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. CRC Press Inc. Boca Raton, Lewis Publishers, 2.ed. Florida, 245p., 1995.

HEDDLE, J.A.A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-192, 1973.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMON, M. F. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research – Genetic Toxicology**. v. 123, p. 61-118, 1983.

HORI, T.S.F. et al. Impairment of the stress response in matrinxã juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol**. Comp. Biochem.Physiol**. **C** v. 147, p. 416-423. (2008).

KUBITZA, F. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 3.ed. Piracicaba: Degaspari, 1999. 96p.

LAUREN, D.P.; MCDONALD, D.G. Effects of copper on branchialiono regulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*Richardson. **J.comp.Physiol. B.** v. 155, p. 635-644, 1985.

LEMOS, C. T.; IRANÇO, F. A.; OLIVEIRA, N. C. D.;SOUZA, G. D.; FACHEL, J. M. G. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. **Science ofthe Total Environment**, v. 406, Issues 1-2, p. 337-343, 2008.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment .**J. Chem. Tech. Biotechnol,**v.57, p. 195-211, 1993.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physio**.v. 120A, p. 43-49, 1998.

MENNI, R. C.; GOMEZ, S. E. & LOPEZ-ARMENGOL, F. Subtle relationships: freswater fishes and waterchemistry in southern South América. **Hydrologia**, v 328(3): p 173-197,1996.

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. **MutationResearch**, v.367, p.245-251, 1996.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos: Rima, p. 413-432, 2008.

NRIAGU, J.O.; PACINA, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metal. **Nature**. 333:134-139, 1988.

OSMAN, A.; ALI, E.; HASHEM, M.; MOSTAFA, M.; MEKKAWY, I. Genotoxicity of two pathogenic strains of zoosporic fungi (*Achlya klebsiana* and *Aphanomyces laevis*) on erythrocytes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus***. Ecotoxicologyand Environmental Safety**, v.73, p.24–31, 2010.

OYAKAWA, O. T., AKAMA, A., MAUTARI, K. C. E NOLASCO, J.C. **Peixes de Riachos da Mata Atlântica. São Paulo,** Editora Neotropica. P. 201 2006.

PADRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 26, p.345-356, 1995.

PRÁ, D; GUECHEVA, T.; FRANKE, S.I.R.; KNAKIEVICZ, T.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. Toxicidade e genotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v.1, n.2, 2006.

PRÓSPERI, V. A.; NASCIMENTO, I. A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos e estuarinos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2 ed., p. 270-292, 2008.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed.).**Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios deavaliação.** Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética. (1991).

RAMSDORF, W. A. FERRARO, M. V. M. OLIVEIRA-RIBEIRO C. A. COSTA, J. R. M. CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus.* **Environ Monit Assess** v. 158 p.77–85, 2008.

RAMSDORF, W. A. **UTILIZAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) COMO BIOINDICADORES DE REGIÃO CONTAMINADA POR AGROTÓXICO (FAZENDA CANGÜIRI – UFPR)**, Dissertação (Mestrado em Genética), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RODRIGUEZ, A. F. Os caminhos da água. **Agroanalysis**.v. 6, p. 18-22, 1998.

SERRANO-GARCÍA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronucleiand chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 38, p. 38-45, 2001.

SCHLENK, D.; GOLLON, J.L.; GRIFFIN, B.R. Efficacy of copper sulfate for the treatment of ichthyophthiriasis in channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.10, p.390-396, 1998.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**.v.31, p.9-15, 1975.

SCHULZ, U. H. e MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* As Bioindicator of Water Pollution of Rio dos Sinos, Rs, Brazil, **Braz. J. Biol**., v 61(4): p 615-622, 2001.

SHIBATTA, O. A.; ARTONI, R. F. Sobre a Identidade das Populações Alopátricasde *Astyanax* (Characiformes, Characidae) das Formações Furna 1 e Furna 2 do Parque Estadual de Vila Velha,Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa**, 11 (2): 7-12, jun. 2005

STRAUS, D.L. The acute toxicity of copper to blue tilapia in dilutions of settled pond waters. **Aquaculture**. 219:233-240, 2003.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anormalies and buccal smears, methods development. **Mutation Researchh**. v. 271, p. 69-77, 1992.

UDROIU, I.The micronucleus test in pisceserithrocytes. **Aquatic Toxicology**. v. 79, p. 201-204, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol**.v.13, p. 57-149, 2003.

YADAV, K.K.; TRIVEDI, S.P. Chromosomal aberrations in a fish, *Channa punctata* after *in vivo* exposure to three heavy metals. **Mutation Research**. 678:7-12, 2009a.

YADAV, K.K.; TRIVEDI, S.P. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctate*. **Chemosphere**. v. 77, p. 1495-1500, 2009b.

8. APÊNDICE

8.1 Tabelas das analises estatísticas.

	Resultados Estatísticos Grupo Controle								Resultados Estatísticos Grupo Contaminado							
Número de Células Contadas por Lâmina	**500**		**1000**		**2000**		**4000**		**500**		**1000**		**2000**		**4000**	
H =	14.1768		13.9012		20.6603		40.8332		10.2030		17.4101		20.0872		43.4485	
Graus de liberdade =	5		5		5		5		5		5		5		5	
(p) Kruskal-Wallis =	0.0145		0.0162		0.0009		0.0000		0.0697		0.0038		0.0012		0.0000	
R 1 (posto médio) =	36.0000		34.5000		32.0000		25.0000				42.1333		42.7667		35.4333	
R 2 (posto médio) =	38.7143		37.1429		39.8214		53.1071				42.8333		49.9333		58.7000	
R 3 (posto médio) =	36.0000		37.1429		37.3571		29.5714				39.1000		35.0667		32.6000	
R 4 (posto médio) =	63.8929		63.2143		67.1071		72.1429				70.7333		69.9667		78.8667	
R 5 (posto médio) =	36.0000		37.1429		32.0000		27.2857				36.5000		32.5000		25.5000	
R 6 (posto médio) =	44.3929		45.8571		46.7143		47.8929				41.7000		42.7667		41.9000	
Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor	Dif. Postos	p-valor	Dif. Postos	p-valor	Dif. Postos	p-valor			Dif. Postos	p-valor	Dif. Postos	p-valor	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	2.7143	0.7684	2.6429	0.7744	7.8214	0.3962	28.1071	0.0023			0.7000	0.9415	7.1667	0.4525	23.2667	0.0147
Grupos (1 e 3) =	0.0000	1.0000	2.6429	0.7744	5.3571	0.5612	4.5714	0.6200			3.0333	0.7505	7.7000	0.4196	2.8333	0.7665
Grupos (1 e 4) =	27.8929	0.0025	28.7143	0.0018	35.1071	0.0001	47.1429	< 0.0001			28.6000	0.0027	27.2000	0.0044	43.4333	< 0.0001
Grupos (1 e 5) =	0.0000	1.0000	2.6429	0.7744	0.0000	1.0000	2.2857	0.8042			5.6333	0.5548	10.2667	0.2818	9.9333	0.2977
Grupos (1 e 6) =	8.3929	0.3626	11.3571	0.2180	14.7143	0.1105	22.8929	0.0130			0.4333	0.9638	0.0000	1.0000	6.4667	0.4978
Grupos (2 e 3) =	2.7143	0.7684	0.0000	1.0000	2.4643	0.7892	23.5357	0.0107			3.7333	0.6955	14.8667	0.1191	26.1000	0.0062
Grupos (2 e 4) =	25.1786	0.0063	26.0714	0.0047	27.2857	0.0031	19.0357	0.0390			27.9000	0.0034	20.0333	0.0357	20.1667	0.0345
Grupos (2 e 5) =	2.7143	0.7684	0.0000	1.0000	7.8214	0.3962	25.8214	0.0051			6.3333	0.5067	17.4333	0.0676	33.2000	0.0005
Grupos (2 e 6) =	5.6786	0.5379	8.7143	0.3446	6.8929	0.4547	5.2143	0.5717			1.1333	0.9054	7.1667	0.4525	16.8000	0.0782
Grupos (3 e 4) =	27.8929	0.0025	26.0714	0.0047	29.7500	0.0013	42.5714	< 0.0001			31.6333	0.0009	34.9000	0.0003	46.2667	< 0.0001
Grupos (3 e 5) =	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	5.3571	0.5612	2.2857	0.8042			2.6000	0.7852	2.5667	0.7879	7.1000	0.4567
Grupos (3 e 6) =	8.3929	0.3626	8.7143	0.3446	9.3571	0.3101	18.3214	0.0469			2.6000	0.7852	7.7000	0.4196	9.3000	0.3296
Grupos (4 e 5) =	27.8929	0.0025	26.0714	0.0047	35.1071	0.0001	44.8571	< 0.0001			34.2333	0.0003	37.4667	< 0.0001	53.3667	< 0.0001
Grupos (4 e 6) =	19.5000	0.0344	17.3571	0.0597	20.3929	0.0270	24.2500	0.0085			29.0333	0.0023	27.2000	0.0044	36.9667	0.0001
Grupos (5 e 6) =	8.3929	0.3626	8.7143	0.3446	14.7143	0.1105	20.6071	0.0254			5.2000	0.5857	10.2667	0.2818	16.4000	0.0856

	P value	**Wording**	**Summary**
R1 - Micronucleo			
R2 - Blebbed	< 0.001	Extremely significant	***
R3 - Lobed	0.001 to 0.01	Very significant	**
R4 - Notched	0.01 to 0.05	Significant	*
R5 - Binucleus	>0.05	Not significant	ns
R6 - Vacoulated			

Comparação das Frequências de Alterações no grupo Controle		
Não foi encontrado micronúcleo no grupo Controle		
Comparação das frequências dentro das contagens para Blebbed	Resultados	
H =	9,8884	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,0195	
R 1 (posto médio) =	23,5	
R 2 (posto médio) =	23,3214	
R 3 (posto médio) =	27,1071	
R 4 (posto médio) =	40,0714	
Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	0,1786	0,9769
Grupos (1 e 3) =	3,6071	0,5584
Grupos (1 e 4) =	16,5714	0.0072**
Grupos (2 e 3) =	3,7857	0,5391
Grupos (2 e 4) =	16,7500	0.0066**
Grupos (3 e 4) =	12,9643	0.0355*
Comparação das frequências dentro das contagens para Lobed	Resultados	
H =	0,5601	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,9055	
Comparação das frequências dentro das contagens para Notched	Resultados	
H =	1,8433	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,6056	
Comparação das frequências dentro das contagens para Binucleus	Resultados	
H =	0,2107	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,9759	
Comparação das frequências dentro das contagens para Vacuolated	Resultados	
H =	1,2570	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,7394	

R1 - 500 células/lâmina
R2 - 1000 células/lâmina
R3 - 2000 células/lâmina
R4 - 4000 células/lâmina

Comparação das Frequências de Alterações no grupo Exposto ao Sulfato de Cobre (0,039 mg/l)		
Comparação das frequências dentro das contagens para MN	Resultados	
H =	0,9945	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,8026	
Comparação das frequências dentro das contagens para Blebbed	Resultados	
H =	7,9254	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,0476	
R 1 (posto médio) =	26,4	
R 2 (posto médio) =	24,1333	
R 3 (posto médio) =	30,8	
R 4 (posto médio) =	40,6667	
Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	2,2667	0,7223
Grupos (1 e 3) =	4,4	0,4902
Grupos (1 e 4) =	14,2667	0.0253*
Grupos (2 e 3) =	6,6667	0,2958
Grupos (2 e 4) =	16,5333	0.0095*
Grupos (3 e 4) =	9,8667	0.1218ns
Comparação das frequências dentro das contagens para Lobed	Resultados	
H =	0,8712	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,8324	
Comparação das frequências dentro das contagens para Notched	Resultados	
H =	0,4963	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,9197	
Não foi encontrado Binucleus no grupo Exposto		
Comparação das frequências dentro das contagens para Vacuolated	Resultados	
H =	2,38	
Graus de liberdade =	3	
(p) Kruskal-Wallis =	0,4974	

R1 - 500 células/lâmina
R2 - 1000 células/lâmina
R3 - 2000 células/lâmina
R4 - 4000 células/lâmina