

OCORRÊNCIA DE ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCITÁRIAS NO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia coriiceps* EXPOSTO A CONDIÇÕES DE HIPERTERMIA

**BRUNA ZAFALON DA SILVA¹; YURI DORNELES ZEBRAL¹; ADALTO BIANCHINI²;
 CARLOS EDUARDO DA ROSA²; VERA LUCIA BOBROWSKI¹; RICARDO
 BERTEAUX ROBALDO¹**

¹ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, 96010-970, Capão do Leão, RS, Brasil
brunazs@gmail.com

² Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil

1. INTRODUÇÃO

Os organismos polares evolutivamente possuem seus ciclos sazonais ajustados à interface dinâmica gelo-água, onde estas espécies, geralmente possuem limites termotolerantes de 2 a 4 vezes mais sensíveis do que as espécies de latitudes inferiores (PARMESAN et al., 2003; PECK et al., 2004). Portanto, com o aumento da temperatura da água, pressupõe-se que os animais ectotérmicos e estenotérmicos endêmicos da região Antártica sejam mais afetados pelo aquecimento global, devido a sua característica de dependência da temperatura ambiental para seu controle homeostático (MIRKES, 1997).

Partindo deste contexto, espécies antárticas endêmicas como as da família dos Notothenidae, evoluíram em ambiente com baixa variação térmica, desenvolvendo assim mecanismos fisiológicos para impedir o congelamento de seus fluídos corporais, através das glicoproteínas anticongelantes (JIN et al., 2006).

Segundo NGAN et al. (2007), alguns notothenídeos são costeiros e sedentários, caracterizando-os como sentinelas no biomonitoramento da qualidade ambiental. Neste contexto, alterações nucleares eritrocitárias (ANEs) podem ser utilizadas como uma das formas de monitorar o efeito das condições ambientais às quais os indivíduos estão submetidos, devido a sua sensibilidade a agentes estressores bem como tratar-se de uma técnica analítica de fácil execução e baixo custo (BARCELLOS et al., 2003; MONSERRAT et al., 2007).

Considerando-se a hipótese de que espécies estenotérmicas endêmicas da Antártica tiveram sua capacidade de aclimatização térmica reduzida, o principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao aumento de temperatura sobre processos de estresse celular e organizmico através da análise da frequência de ocorrência de anormalidades nucleares eritrocitárias no peixe antártico *Notothenia coriiceps*.

2. METODOLOGIA

Indivíduos adultos de *N. coriiceps* foram capturados com anzol e linha na Baía do Almirantado, próximo à Estação Antártica Polonesa Henry Arctowski (62°10'06,8"S; 58°29'50,7"W), na isóbata de 10 m durante o verão de 2007. Após a coleta, os animais foram transferidos para o Laboratório de Biologia da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (62°8'S; 58°40' W), onde foram aclimatados.

Após o período de aclimação, os peixes foram aleatoriamente divididos em três grupos e submetidos a duas condições de aumento de temperatura, com ajuste

gradual da temperatura em 0,5°C/h até atingir 2 ou 4°C (n=5 por tratamento), onde foram mantidos a 0°C (controle), 2 e 4°C por 6 dias (144hs).

Após exposição aos tratamentos experimentais, os peixes foram anestesiados com benzocaína (100 mg/l), e realizada a biometria. A seguir, foram coletadas amostras de sangue periférico por punção da artéria branquial para confecção das extensões sanguíneas, as quais foram secas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24 h, fixadas em metanol por 15 min e posteriormente coradas com Giemsa (10%).

As extensões foram avaliadas sob microscopia óptica (aumento de 1000X) para avaliação de ANEs (MN: micronúcleo; BL: núcleo bilobado; BRT: núcleo com brotamento; NC: núcleo com cavidade; BN: célula binucleada; Fig. 1), utilizando-se os critérios descritos por TITENKO-HOLLAND et al. (1997) e FENECH et al. (2003). Foram analisadas 5000 células vermelhas, as quais foram classificadas e quantificadas como eritrócitos e eritroblastos.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o pacote estatístico Statistica 8.0[®] (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Diferenças entre as frequências médias de ANEs foram analisadas por análise de variância não paramétrica (Kruskall-Wallis ANOVA; $P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise qualitativa das amostras dos diferentes tratamentos foi observada a ocorrência das seguintes ANEs: micronúcleos (MN), brotamentos (BRT), núcleos bilobulados (BL), núcleos com cavidades (NC) e células binucleadas (BN) e a análise quantitativa demonstrado na Tabela 1.

A análise da frequência de ocorrência das ANEs em eritrócitos indicou um aumento significativo para as anormalidade BL e NC (Tabela 1), sendo observada uma correlação positiva significativa (BL = $0,0008 + 0,001 * t$; $r^2 = 0,45$; $p = 0,008$); (NC = $0,001 + 0,0005 * t$; $r^2 = 0,31$; $p = 0,04$). Ainda foi observada diferença significativa de ocorrência entre em eritrócitos e eritroblastos para estas mesmas as anormalidades.

Tabela 1. Frequência (%) de ocorrência ($\times 10^3$) de alterações nucleares eritrocitárias (ANEs) em eritrócitos e eritroblastos (média \pm erro padrão) conforme o aumento de temperatura.

Temperatura	Tipo celular	Micronúcleo	Núcleo bilobado	Núcleo com brotamento	Núcleo com cavidade	Binucleada
0°C	Eritrócito	0.00 \pm 0.00	1.12 \pm 1.24 ^A	2.84 \pm 2.89	1.23 \pm 0.71 ^A	0.05 \pm 0.12
	Eritroblasto	0.00 \pm 0.00	1.65 \pm 2.25 ^{b*}	0.17 \pm 0.35	0.12 \pm 0.20 ^{b*}	0.00 \pm 0.00
2°C	Eritrócito	0.42 \pm 0.84	2.07 \pm 1.28 ^A	2.64 \pm 1.86	2.14 \pm 1.17 ^A	0.06 \pm 0.12
	Eritroblasto	0.39 \pm 0.47	0.30 \pm 0.59 ^b	0.51 \pm 0.58	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00
4°C	Eritrócito	0.29 \pm 0.27	5.30 \pm 3.07 ^B	3.38 \pm 1.02	3.43 \pm 2.22 ^B	0.06 \pm 0.13
	Eritroblasto	0.24 \pm 0.54	0.00 \pm 0.00 ^{a*}	0.87 \pm 1.50	0.00 \pm 0.00 ^{a*}	0.00 \pm 0.00

^a Diferentes letras maiúsculas e minúsculas representam diferenças significativas entre os tratamentos para eritrócitos e eritroblastos, respectivamente.

* indica diferença significativa entre os tipos celulares para o mesmo tratamento (Kruskall-Wallis ANOVA; $P < 0,05$).

Para análise de variação, na ocorrência entre eritrócitos e eritroblastos, devem ser considerados os mecanismos de ocorrência das ANEs, bem como a relação entre o tempo de maturação das células da série vermelha e sua liberação na circulação periférica. Nos peixes antárticos, a longevidade média dos eritrócitos

pode alcançar 400 dias (SOLDATOV, 2003), sendo este dado desconhecido para *N. coriiceps*.

ANEs como MN e BN são formadas durante o período de mitose, quando o estresse térmico promove inativação da enzima de reparação de DNA (PRABHAKARA e MURTHY, 1995). Segundo AFANASIEVA et al. (2006), anormalidades como BRT tem sua possível origem vinculada à amplificação gênica, podendo resultar da quebra de pontes nucleoplásmicas durante a citocinese. Logo, espera-se que a observação destas anormalidades deva ocorrer principalmente em eritroblastos, tendo em vista que foram avaliados efeitos experimentais.

Quanto à frequência de ocorrência de BL, foi observado um aumento desta ANE com o aumento da temperatura. Segundo TAVARES-DIAS (2004), os núcleos BL possuem sua frequência relacionada a uma resposta imediata à hipóxia, aumentando a capacidade de transporte do oxigênio na célula. Os resultados obtidos para BL no presente estudo permitem relacionar sua resposta ao aumento de temperatura da água, uma vez que o estresse térmico provoca o aumento da taxa metabólica. Este efeito induz secundariamente a um aumento da frequência cardiorrespiratória em função da demanda de oxigênio aumentada (ELLIS, 1982; TAVARES-DIAS et al., 2004).

Na exposição em longo prazo, o NC foi umas das anormalidades que apresentou resposta diferenciada entre os tipos celulares e os tratamentos (0° e 4°C). Este aumento de frequência de ocorrência nos eritrócitos com o aumento de temperatura (4°C) pode estar relacionado ao processo de senescência celular.

Estudos demonstram que as proteínas chaperonas, como as hsp70, promovem estabilidade estrutural celular (SORENSEN et al., 2003; LIBEREK et al., 2008). Considerando que alguns peixes antárticos estenotérmicos perderam a capacidade de aumentar a expressão destas proteínas frente a condições térmicas desfavoráveis (PLACE et al., 2008), pode-se inferir que algumas das ANEs observadas em *N. coriiceps* podem estar relacionadas à ausência de expressão indutiva das chaperonas nessa espécie quando exposta ao aumento de temperatura da água.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, o conjunto de efeitos da exposição do peixe antártico *N. coriiceps* ao aumento da temperatura da água, induz a ocorrência de anormalidades nucleares eritrocitárias.

Estas respostas foram caracterizadas pelo aumento da frequência de células vermelhas com núcleos bilobados e com cavidade após exposição dos peixes, por 144 h ao aumento da temperatura. Além disso, conclui-se que os eritrócitos e os eritroblastos respondem distintamente ao estresse térmico, indicando, portanto, que os estudos de anomalias nucleares em sangue periférico devem levar em consideração estas respostas diferenciais dos dois tipos celulares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANASIEVA K, RUSHKOVSKY S, BERZUKOV V Parameters of chromosomal instability of *Pygoscelis papua*. **Bulgarian Antarctic Research**, Moscow, v.5, p.9-13; 2006

- BARCELLOS GLJ, KREUTZ LC, RODRIGUES LB, FIOREZE I, QUEVEDO RM, CERICATO L, CONRAD J, SOSO AB, FAGUNDES M, ALMEIDA LACERDA L, TERRA S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, 34: 1465–1469; 2003
- ELLIS AE; Bizarre forms of erythrocytes in a specimen of plaice, *Pleuronectes platessa*. **Journal Fish Diseases** 7, 411–414; 1982
- FENECH M, CHANG WP, 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. **Mut. Res.** 534, 65–75; 2003
- JIN Y, DeVRIES AL; Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol** 144(3):290-300; 2006
- LIBERECK K, LEWANDOWSKA A, ZIETKIEWICZ S; Chaperones in control of protein disaggregation. **EMBO J.** January 23; 27(2): 328–335; 2008
- MIRKES PE; Molecular/cellular biology of the heat stress response and its role in agent-induced teratogenesis. **Mutation Res.**, 396: 163-173; 1997
- MONSERRAT JM, MARTINEZ PE, GERACITANO LA, AMADO LL, MARTINS C MG, PINHO G LL, CHAVES IS, FERREIRA-CRAVO, M, LIMA JV, BIANCHINI A; Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology*, p. 221-234; 2007
- NGAN VP, GOMES V, PASSOS MJACR, USSAMI KA, CAMPOS DYF, ROCHA AJS, PEREIRA BA; Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station. **Polar Biology**, v. 30, p. 209-217; 2007
- PARMESAN C, YOHE G; A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. **Nature** 421: 37–42; 2003
- PECK LS, ANSELLI AD, WEBB KE, HEPBN L; BURROWS MT; Movements and burrowing activity in the Antarctic bivalve molluscs *Laternula elliptica* and *Yoldia eightsi*. **Polar Biology**, 27, 357-367; 2004
- PLACE SP, HOFMANN GE Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, *hsp70*, in phylogenetically distant Antarctic fish. **Polar Biol** 28: 261–267; 2004
- PRABHAKARA K, MURTHY SK; Hyperthermic induction of premature chromosome condensation in human lymphocytes. **Mutat Res.** 1995
- SOLDATOV A; Peculiarities of Organization and Functioning of the Fish Red Blood System. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, Vol. 41, No. 3, 2005
- SORENSEN JG, KRISTENSEN TN, LOESCHCKE V; The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. **Ecology Letters**, 6: 1025–1037; 2003
- TAVARES-DIAS M, MORAES FR; **Hematologia de Peixes Teleósteos**. 1. ed. Ribeirão Preto: Villimpress, v. 1000. 144 p; 2004
- TITENKO-HOLLAND N, WINDHAM G, KOLACHANA P, REINISCH F, PARVATHAM S, OSORIO AM, SMITH MT; Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers. **Mutation Res.**, 338: p. 85-95; 1997