

ALTERAÇÕES GENOTÓXICAS COMO BIOMARCADORES EM PEIXES DE UMA ÁREA PROTEGIDA DO SUL DO MARANHÃO

Eugênia Miranda AGUIAR^{1*}; Fernando Ferreira ARAÚJO¹; Gabriella Santos PIRES¹; Layla Karolyne Dourado STRAGLIOTTO¹; Fernanda Silva da PAZ²; Dannielle Silva da PAZ²; Raimunda Nonata Fortes CARVALHO-NETA² & Débora Batista PINHEIRO-SOUSA¹

¹Universidade Federal do Maranhão

²Universidade Estadual do Maranhão

*email: eugenia.amiranda@hotmail.com

Recebido em: 19/12/2017

Resumo - Neste estudo, objetivou-se utilizar biomarcadores genotóxicos para avaliação de impacto ambiental em peixes do Parque Nacional da Chapada das Mesas (PNCM). Exemplares de *Leporinus fasciatus* (piauí cabeça-gorda) e *Hypostomus pusalum* (cascudo) foram coletados em duas cachoeiras do PNCM: a de São Romão e a da Prata. As estações foram georreferenciadas por Global Position System (GPS) e, em cada região, foram registradas variáveis abióticas: pH, temperatura, sólidos totais dissolvidos (STD), oxigênio dissolvido (OD) e condutividade. Os dados biométricos foram medidos em campo. Para tanto, as lâminas com esfregaços de sangue foram deixadas em temperatura ambiente por 2 horas para secagem e, em seguida, fixadas em etanol absoluto por 30 minutos. Depois de secas, foram coradas em corante Giemsa. Para a quantificação dos eritrócitos, foram utilizadas 2.000 células. Foram identificadas alterações morfológicas nucleares (AMN) nas duas espécies amostradas para os dois pontos de coleta. Dentre as AMN encontradas, destacam-se os núcleos binucleados (NB) e os núcleos vacuolizados (NV). Os micronúcleos (MN) também foram encontrados em ambas as espécies, porém, em *L. fasciatus*, as frequências de MN e AMN foram maiores em relação a *H. pusalum*. Provavelmente, o cascudo (*H. pusalum*), por ser considerado uma espécie bentônica e resistente às condições ambientais, apresentou uma frequência menor de alterações genotóxicas em relação ao *L. fasciatus*, espécie que apresenta hábito migratório e é sensível às variáveis ambientais. Além disso, as frequências de MN e AMN não foram significativas para indicativo de possíveis impactos ambientais nas duas áreas amostradas. Os dados apresentados mostram que as metodologias baseadas em biomarcadores em espécies residentes podem ser utilizadas em futuros programas de biomonitoramento e gestão do parque.

Palavras-chave: monitoramento ambiental, micronúcleos, parques nacionais, piauí cabeça-gorda (*Leporinus fasciatus*), cascudo (*Hypostomus pusalum*).

GENOTOXIC CHANGES AS BIOMARKERS IN FISH OF A PROTECTED AREA OF SOUTH OF MARANHÃO

Abstract - This study aimed to use genotoxic biomarkers to evaluate environmental impacts in fish from the Chapada das Mesas National Park (CMNP). *Leporinus fasciatus* (piauí cabeça-gorda) and *Hypostomus pusalum* (cascudo) were collected in two waterfalls of CMNP: São Romão and Prata Waterfalls. The stations were georeferenced by GPS (Global Position System) and abiotic variables were collected in every region: pH, temperature, total dissolved solids (TDS), dissolved oxygen (DO) and conductivity. Biometric data were measured in the field. To this end, blood smear slides were left at room temperature for 2 hours for drying and then fixed in absolute ethanol for 30 minutes. After drying, the slides were stained with Giemsa dye. Two thousand cells were used for the quantification of erythrocytes. Nuclear morphological changes (NMA) were identified in the two sampled species for the two collection points. Among the NMA's found are: binucleated nucleus (BN) and vacuolated nucleus (VC); micronucleus (MN) were also found in both species, although the frequency of MN and AMN in *L. fasciatus* was higher in relation to *Hypostomus sp.* Probably, the cascudo (*H. pusalum*), considered a benthic species and resistant

to environmental conditions, presented a lower frequency of genotoxic alterations in relation to the *L. fasciatus*, which a species that presents a migratory habit and is sensitive to environmental variables. Also, the frequency of MN and AMN were not significant to indicate possible environmental impacts in the two areas sampled. Thus, the data presented show that the methodology based in biomarkers and resident species can be used for future biomonitoring and management of the park.

Key-words: environmental monitoring, micronuclei, national parks, piau cabeça-gorda (*Leporinus fasciatus*), cascudo (*Hypostomus pusalum*).

Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA).

INTRODUÇÃO

Com o aumento da exploração ecoturística no sul do Maranhão e a intervenção humana no Parque Nacional da Chapada das Mesas (PNCM), diversas modificações têm ocorrido em sua dinâmica, sendo os impactos antrópicos nos corpos aquáticos um dos pontos mais preocupantes. Nesse contexto, pesquisas relacionadas à gestão e ao biomonitoramento dos ecossistemas aquáticos do PNCM são de extrema relevância para auxiliar nos processos de tomada de decisão da comunidade local e dos gestores responsáveis pela estruturação e implementação do plano de manejo dessa área protegida.

Todavia, ainda são inexistentes estudos sobre a ictiofauna do sul do Maranhão, bem como apoio financeiro às investigações científicas relacionadas ao aprofundamento das discussões sobre a qualidade ambiental do PNCM, especialmente sobre os efeitos da biota da região, a fim de subsidiar programas de biomonitoramento e gestão ambiental exigidos pela Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000, que define o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (Brasil, 2000).

Os corpos aquáticos recebem uma infinidade de efluentes, contaminantes e misturas químicas complexas (Barkhordar, Valizadeh, Bagheri, Taherimirghaed & Hedayati, 2013) que interagem constantemente com os organismos que residem nesses ambientes. Nesse contexto, os testes de genotoxicidade são indispensáveis para estudos de biomonitoramento, pois avaliam o grau dos impactos e as respostas biológicas nos organismos aquáticos (WHO, 1993; Carvalho-Neta et al., 2015; Pinheiro-Sousa, 2015).

A hematologia, estudo das células sanguíneas, é um importante indicador de qualidade ambiental por refletir o estado de saúde dos peixes (Singh & Srivastava, 2010). Tal metodologia auxilia no diagnóstico e prognóstico de condições de morbidade em populações de peixes. À medida que os indivíduos são expostos a substâncias tóxicas, alguns parâmetros biológicos podem ser alterados (Adhikari, Sarkar, Chatterjee, Mahapatra & Ayyappan, 2004; França, Ranzani-Paiva, Lombardi, Carvalho & Seriani, 2007; Barkhordar, Valizadeh, Bagheri, Taherimirghaed & Hedayati, et al., 2013), tais como as células sanguíneas.

O material genético de células eucarióticas das espécies ícticas também pode ser alterado mediante exposição a substâncias químicas dissolvidas na água, resultando na formação de micronúcleos (MN), os quais podem ser utilizados como biomarcadores para avaliar o grau de contaminação no meio ambiente (Silva, Canova, Guimarães & Adam, 2008). Os MN são provenientes de fragmentos cromossômicos resultantes de quebras que não são incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose em decorrência de danos introduzidos nas células

parentais (Galvan, 2011).

Nesse contexto, faz-se necessário o desenvolvimento e a padronização de metodologias capazes de prever os efeitos dos possíveis impactos nos organismos aquáticos no PNCM. Entre essas metodologias, o uso de alterações genotóxicas em peixes é particularmente importante porque mostra respostas biológicas iniciais, podendo ser útil para subsidiar ações de monitoramento e de gestão ambiental (Pinheiro-Sousa, 2015). Para tanto, tal método pode ser considerado como um excelente biomarcador, que são respostas biológicas ao estresse provocado pelos poluentes e/ou estressores físicos e podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos nos organismos aquáticos (Hinton et al., 1992).

Dessa forma, a geração dos dados sobre genotoxicidade pode ser uma ferramenta eficaz para a atuação dos órgãos ambientais estaduais e federais no que diz respeito a políticas de manejo e monitoramento em áreas distintas no PNCM. Assim, o presente trabalho visa utilizar parâmetros genotóxicos como biomarcadores em espécies de peixe dulcícolas (*L. fasciatus* e *H. puarum*) a fim de avaliar a qualidade ambiental de pontos distintos no PNCM e subsidiar programas de biomonitoramento na região.

MATERIAL E MÉTODOS

DETERMINAÇÃO DE LICENÇA E DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

A coleta dos peixes foi realizada por meio da autorização de pesquisa do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio — SISBIO, 50232-2/2017). O protocolo do Comitê de Ética foi aprovado pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA 13/2017 CRMV-MA) mediante a Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA).

ÁREA DE ESTUDO

O PNCM (Figura 1) é uma Unidade de Conservação (UC) que está inserida no sul do Estado do Maranhão, entre os municípios de Riachão, Estreito e Carolina (Brasil, 2005).

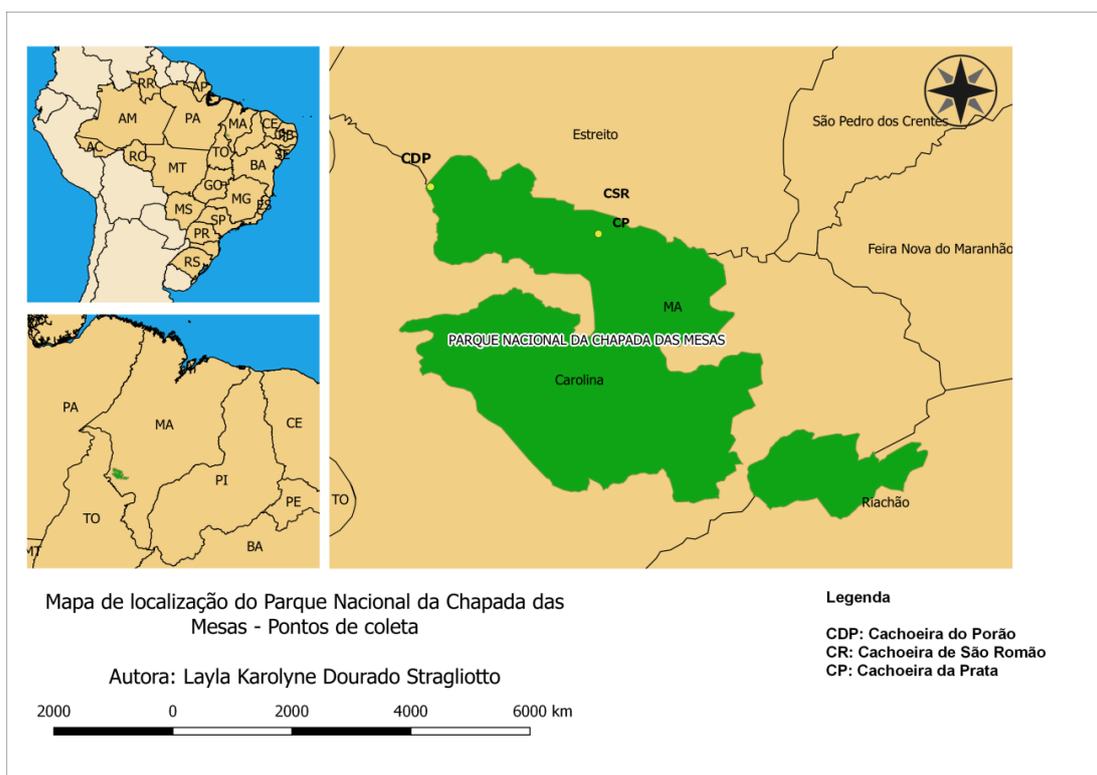


Figura 1. Mapa da localização do Parque Nacional da Chapada das Mesas (MA). Pontos de amostragem: CSR) Cachoeira de São Romão; CP) Cachoeira da Prata.

O território dessa UC situa-se na bacia do rio Tocantins e possui destaque pelo rio Farinha, com duas grandes cachoeiras chamadas São Romão e Prata; além disso, esse rio é um afluente da margem esquerda do rio Tocantins, o que garante uma importância significativa para a região central do País (Marques, 2012). A cor das águas possui tonalidades diferenciadas: a água corre por areias que variam do vermelho-escuro, passando pelo amarelo-alaranjado até quase brancas (Marques, 2012). A região possui uma hidrografia muito rica: além do rio Farinha, existem outros como o Corrente, o Itapecuru, o Lajinha e o Urupuchete (Ibama, 2007). O clima se caracteriza por tropical úmido, com duas estações bem definidas: verão (maio a outubro) e inverno (novembro a abril); de julho a setembro, devido aos focos de incêndios, a seca é mais rigorosa (Ibama, 2007). As temperaturas variam: 26,1°C é a média anual, com mínimas de 25,2°C em janeiro e 27,8°C no mês de setembro e máximas de 36°C em julho e agosto (Ibama, 2007).

DETERMINAÇÃO DAS ÁREAS AMOSTRAIS NO PARQUE NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS E COLETA DOS PEIXES

No total, 57 peixes foram amostrados no PNCM nas seguintes cachoeiras: de São Romão (n = 23) e da Prata (n = 34). As estações foram georreferenciadas por Global Positioning System (GPS). Em todas as áreas de coleta dos peixes, foram registrados os dados das seguintes variáveis

abióticas: pH, temperatura, oxigênio dissolvido (OD), condutividade e sólidos totais dissolvidos (STD).

Os peixes foram capturados no período chuvoso (março de 2017) e no período de estiagem (junho e novembro de 2017), com redes fixas de espera na montante e na jusante das cachoeiras. Os gêneros selecionados para análise dos biomarcadores foram o *L. fasciatus* e *Hypostomus pusalum*. A seleção das espécies está relacionada aos seus hábitos e à sua frequência ao longo de todos os anos nos rios e nas cachoeiras do PNCM.

ANÁLISES GENOTÓXICAS E REGISTRO DE DADOS BIOMÉTRICOS DOS PEIXES

Exemplares de *L. fasciatus* e *H. pusalum* foram amostrados, transferidos para uma cuba plástica com água e, posteriormente, anestesiados com eugenol 150 mg/L por 5 minutos. Em seguida, para as análises genotóxicas, coletou-se parte do sangue pelos vasos sanguíneos das brânquias com o auxílio de seringas heparinizadas. Uma gota de sangue de cada exemplar amostrado foi distribuída em uma lâmina microscópica para a realização do esfregaço. Posteriormente, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 24 horas para secagem e depois fixadas em etanol absoluto por 30 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas em Giemsa 10% diluída em tampão fosfato e pH 6,8 para a visualização no microscópio. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico e as alterações encontradas foram fotomicrografadas em fotomicroscópio LEICA DM500.

O teste do MN com coloração Giemsa em eritrócitos foi realizado de acordo com Dittmar, Luna e Caetano Filho (2010) e Polard et al. (2011) para a determinação da frequência de MN e de alterações morfológicas nucleares (AMN). Além dos MN, as AMN nos eritrócitos também foram classificadas como indicativas de genotoxicidade de acordo com Ayllón & Garcia-Vazquez (2001) e Galvan (2011). Para a quantificação e análise dos eritrócitos, foram analisadas 2.000 células para cada lâmina confeccionada.

Posteriormente, para cada exemplar de peixe, foram registrados os dados biométricos, tais como comprimento total (CT), comprimento padrão (CP) e comprimento furcal (CF), em centímetros, e peso total (PT), em gramas.

DETERMINAÇÃO DO TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, e as médias dos resultados obtidos foram comparadas entre si por meio de teste *t* de Student. Para a localização das diferenças entre as médias obtidas para os dois locais de coleta e os dados biométricos, foi utilizado o teste de comparações múltiplas ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS AMBIENTAIS EM CACHOEIRAS DO PARQUE NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS

Os valores médios das variáveis abióticas registradas no PNCM durante todo o período amostrado (chuvoso e de estiagem) foram medidos e estão indicados na Tabela 1. As temperaturas mantiveram-se praticamente constantes nas duas áreas durante as coletas no período chuvoso e de estiagem.

Tabela 1. Parâmetros ambientais aferidos nas cachoeiras de São Romão e da Prata, no Parque Nacional da Chapada das Mesas (MA).

Parâmetros	Cachoeira de São Romão		Cachoeira da Prata		Valores recomendados
	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso	Estiagem	
O ₂ dissolvido (ppm) ^a	8,0	8,1	8,0	8,1	> 5 mg/L ^b
pH ^a	7,8	8,9	7,0	8,5	6,5–8,0 ^b
Temperatura (°C) ^a	28,8	29,1	28,9	29	28–32°C ^b
Condutividade	30,5	32,6	30,1	32,9	--
Sólidos totais dissolvidos	29,6	20,1	29,8	20,8	500 mg/L

^amédia; ^bResolução nº 357, do CONAMA, de 17 de março de 2005; e Resolução nº 430, do CONAMA, de 13 de maio de 2011.

Esses dados indicam que todos os parâmetros físico-químicos das cachoeiras do PNCM estão em conformidade com os valores aceitos pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). A Resolução nº 430 do CONAMA, de 17 de maio de 2011, que complementa e altera a Resolução nº 357/2005, de 17 de março de 2005, apresenta valores específicos que classificam os corpos de água doce (lênticos e lóticos) e mostra que, abaixo dos níveis recomendados, esses valores podem causar alterações adaptativas na morfologia dos eritrócitos das espécies bioindicadoras (tais como os peixes) e, conseqüentemente, uma diminuição nos valores de hematócritos (Brasil, 2005; 2011; Oba, Mariano & Santos, 2009).

BIOMETRIA DAS ESPÉCIES

Leporinus fasciatus

Os resultados da análise estatística dos dados biométricos de *L. fasciatus* (piauí cabeçagorda), nas cachoeiras de São Romão e da Prata, podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados biométricos de *Leporinus fasciatus* coletados nas cachoeiras de São Romão e da Prata, no Parque Nacional da Chapada das Mesas (MA), nos períodos chuvoso e de estiagem.

Parâmetros	Média±Desvio padrão			
	Cachoeira de São Romão		Cachoeira da Prata	
	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso	Estiagem
CT (cm)	13,87 ± 1,55*	11,99 ± 1,74	18,23 ± 1,12*	11,72 ± 2,00*
CF (cm)	14,74 ± 1,55	10,62 ± 1,65*	16,60 ± 8,40*	11,52 ± 1,70
CP (cm)	12,35 ± 2,49	9,53 ± 1,39	15,30 ± 0,34	10,64 ± 1,66
PT (g)	15,12 ± 9,66*	17,15 ± 10,66*	51,33 ± 28,58*	18,75 ± 11,61*

*Indica uma diferença estatística ($p < 0,05$). Total de indivíduos amostrados: 25. Número de espécies na Cachoeira de São Romão: 10. Número de espécies na Cachoeira da Prata: 15. Dados biométricos: CT: comprimento total; CF: comprimento furcal; CP: comprimento padrão; e PT: peso total.

Os dados biométricos submetidos ao teste de normalidade para *L. fasciatus* mostraram que houve uma diferença estatística em relação à biometria dos táxons durante os períodos de amostragem (estiagem e chuvoso). Porém, a biometria foi maior para o período chuvoso em relação ao de estiagem.

As fêmeas de *L. fasciatus* normalmente são maiores que os machos (Sato, Cardoso, Godinho & Godinho, 1996), e, espécimes de piaui cabeça-gorda apresentam desova total e a sua época reprodutiva ocorre normalmente nos meses de dezembro a março (Tavares & Godinho, 1994). Provavelmente, as capturas no período de estiagem (junho a novembro) trouxeram à amostragem indivíduos menores nas cachoeiras de São Romão e da Prata.

Hypostomus pusalum

Os resultados da análise estatística dos dados biométricos de *H. pusalum*, nas cachoeiras de São Romão e da Prata, podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados biométricos de *Hypostomus pusalum* coletados nas cachoeiras de São Romão e da Prata no Parque Nacional da Chapada das Mesas (MA), nos períodos chuvoso e de estiagem.

Parâmetros	Média±Desvio padrão			
	Cachoeira de São Romão		Cachoeira da Prata	
	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso	Estiagem
CT (cm)	15,17 ± 0,77	22,95 ± 4,63*	14,20 ± 6,42	25,75 ± 5,63*

CF (cm)	14,10 ± 0,01*	19,65 ± 2,77	12,83 ± 5,39*	20,36 ± 3,74
CP (cm)	13,05 ± 0,35	18,00 ± 1,70*	11,76 ± 4,57	19,49 ± 1,50*
PT (g)	26,00 ± 2,82*	32,00 ± 28,28*	13,66 ± 12,66*	90,13 ± 23,81*

*Indica uma diferença estatística ($p < 0,05$). Total de indivíduos amostrados: 32. Número de espécies na Cachoeira de São Romão: 13. Número de espécies na Cachoeira da Prata: 19. Dados biométricos: CT: comprimento total; CF: comprimento furcal; CP: comprimento padrão; e PT: peso total.

Os dados biométricos submetidos ao teste de normalidade para *H. pularum* indicaram que existe uma diferença significativa entre os tratamentos para a cachoeira de São Romão e a da Prata. Contudo, táxons de *H. pularum* capturados no período de estiagem apresentaram valores maiores de CT e PT para as duas áreas de amostragem.

Além disso, os dados de biometria foram maiores para o cascudo em relação ao piau cabeça-gorda. Representantes da família *Locaridae* possuem desova parcelada, o que proporciona vantagem às espécies por reduzir a competição intraespecífica entre elas (Nikolski, 1969; Agostinho et al., 1990). Dessa forma, é provável que o cascudo tenha sido capturado em todos os ciclos reprodutivos para os pontos de amostragem do PNCM, o que conferiu uma biometria maior em relação ao piau cabeça-gorda. Com isso, é possível explicar a variação do CT e do PT entre os diferentes períodos de amostragem (épocas de estiagem e chuvosa). Como o *L. fasciatus* possui hábito migratório ao longo do rio Farinha, provavelmente não foram observados indivíduos maiores (em período reprodutivo) nas cachoeiras de São Romão e da Prata.

BIOMARCADORES GENOTÓXICOS EM PEIXES DO PARQUE NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS

Micronúcleo e alterações morfológicas nucleares em *Leporinus Fasciatus* e *Hypostomus Pularum*

A Tabela 4 mostra a incidência de MN e AMN nos eritrócitos de *L. fasciatus* e *H. pularum* coletados nos diferentes pontos de amostragem no PNCM.

Tabela 4. Quantitativo de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em *Leporinus fasciatus* e *Hypostomus pularum* do Parque Nacional da Chapada das Mesas (MA).

Táxons	Chuvosa							
	Cachoeira de São Romão					Cachoeira da Prata		
	N	MN	NV	NB	NE	MN	NV	NB
<i>Leporinus SP.</i>	15	8	10	15	2	12	0	0
<i>Hypostomus sp.</i>	10	4	1	5	0	2	0	7

Estiagem

Táxons	Cachoeira de São Romão					Cachoeira da Prata		
	N	MN	NV	NB	NE	MN	NV	NB
<i>Leporinus sp.</i>	10	4	0	45	36	22	4	52
<i>Hypostomus sp.</i>	22	4	4	26	10	12	0	0

n: total de indivíduos amostrados; MN: micronúcleo; NV: núcleos vacuolizados; NB: núcleos binucleados; NE: núcleos entalhados.

Os chamados agentes genotóxicos apresentam potencial que pode causar danos ao material genético dos organismos, como rupturas na cadeia do DNA, alterações nos nucleotídeos e mutações (Frenzilli et al., 2004). O teste do MN tem sido uma ferramenta de biomonitoramento bastante utilizada para a análise do aumento da frequência de células micronucleadas; com isso, é possível verificar a qualidade das águas para as populações ali existentes e ajudar na prevenção de doenças causadas por essas alterações (Rivero, 2007). A incidência de MN apresentou-se baixa em relação a AMN nos períodos de amostragem, indicando que o ambiente ainda não apresenta risco significativo para a saúde das espécies. Os MN derivam de fragmentos cromossômicos ou quando na divisão celular ocorre falha na anáfase durante a migração, permitindo que cromossomos fiquem soltos (Fenech et al., 1999). Contudo, as alterações genotóxicas encontradas foram maiores para o piau cabeça-gorda (*L. fasciatus*) em relação ao cascudo (*H. púsarum*), especialmente na época de estiagem.

De acordo com a bioecologia dos táxons, o cascudo apresenta hábito dermesal/bentônico e, provavelmente, é mais resistente às condições ambientais e, conseqüentemente, aos possíveis impactos ambientais do PNCM em relação ao piau cabeça-gorda. Esses dados são importantes e destacam o cascudo como uma espécie bioindicadora mais apropriada para estudos de biomarcadores no PNCM.

A Figura 2 mostra uma fotomicrografia das alterações encontradas em *L. fasciatus* e *H. púsarum* para as duas áreas amostradas em pontos distintos no PNCM. Foram encontradas alterações do tipo: MN, núcleos vacuolizados (NV) e núcleos binucleados (NB).

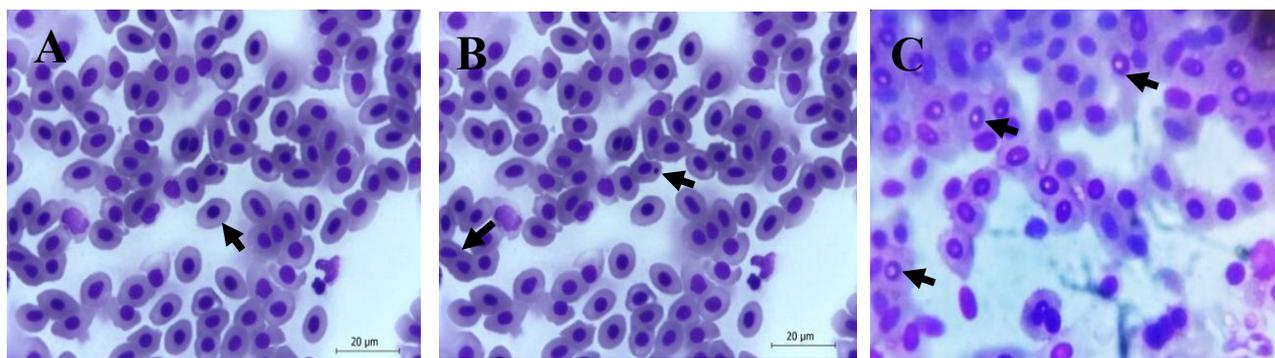


Figura 2. Fotomicrografia dos eritrócitos de *L. fasciatus* e *H. púsarum* coletados no Parque

Nacional da Chapada das Mesas (MA). (A) Detalhe dos eritrócitos mostrando células normais (seta); (B) detalhe dos eritrócitos mostrando célula com núcleo binuclear (seta) e micronúcleo (seta); (C) detalhe dos eritrócitos mostrando núcleos vacuolizados (setas). Giemsa X 1000.

O material genético de células eucarióticas das espécies ícticas também pode ser alterado mediante exposição a substâncias químicas dissolvidas na água, resultando na formação de MN, os quais podem ser utilizados como biomarcadores para avaliar o grau de contaminação no meio ambiente (Silva, Canova, Guimarães & Adam, 2008; Mazzeo & Marin-Morales, 2015). Os micronúcleos são provenientes de fragmentos cromossômicos resultantes de quebras que não são incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose em decorrência de danos introduzidos nas células parentais (Galvan, 2011).

O teste do MN tem a função de detectar alterações cromossômicas estruturais e numéricas, fase importante que ajuda no estudo de substâncias mutagênicas (Heddle et al., 1983). Embora os estudos realizados com MN tenham sido mais empregados em mamíferos, nos ambientes aquáticos eles permitem a observação da existência de propriedades genotóxicas em substâncias presentes no ambiente (Udroiu, 2006; Pinheiro-Sousa, 2015).

As diversas alterações genotóxicas encontradas nas células sanguíneas de organismos aquáticos, tais como os peixes, podem indicar um estado fisiológico e bioquímico comprometido (Adedeji, Adeyemo & Agbede, 2009). Contudo, apesar da ocorrência de MN e AMN nos peixes (piauí cabeça-gorda e cascudo) amostrados nas cachoeiras de São Romão e da Prata, foi possível compreender que a quantidade de alterações não foi elevada em comparação aos valores encontrados para outras UC do Estado do Maranhão (Pinheiro-Sousa, Almeida & Carvalho Neta, 2013; Carvalho-Neta et al., 2015; Pinheiro-Sousa, 2015). Dessa forma, apesar da baixa frequência de AMN e MN, sugere-se que as cachoeiras de São Romão e da Prata ainda não sofrem com fontes pontuais de poluição.

Além disso, na maioria das lâminas analisadas, foram encontradas células do sistema de defesa, tais como os linfócitos, eosinófilos e monócitos (Figura 3). Os leucócitos são células de defesa e seu grupo corresponde aos neutrófilos, aos eosinófilos e aos basófilos, a diferenciação ocorre morfológicamente com base na granulação — são utilizados para realizar monitoramento de infecções ou agressões nos tecidos (Satake, Pádua & Ishikawa, 2009).

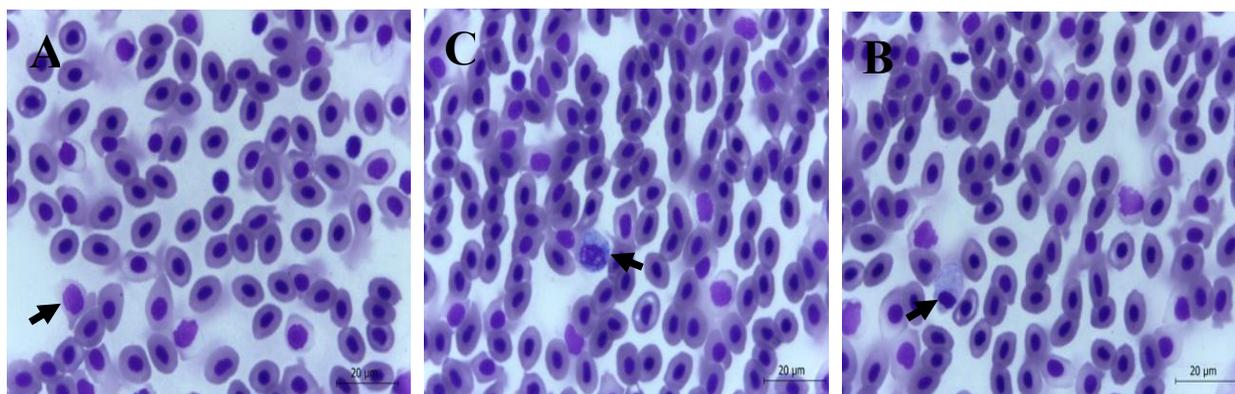


Figura 3. Fotomicrografia dos eritrócitos de *L. fasciatus* e *H. pusarum* coletados no Parque Nacional da Chapada das Mesas (MA). (A) Detalhe dos eritrócitos mostrando células do tipo linfócitos (seta); (B) detalhe dos eritrócitos mostrando células do tipo eosinófilos (seta); (C) Detalhe dos eritrócitos mostrando células do tipo monócitos (seta). Giemsa X 1000.

Os linfócitos apresentam tamanho variado e são células arredondadas, em sua maioria, assim como o seu núcleo, que possui cromatina densa. Sua projeção citoplasmática ajuda a diferenciá-los dos trombócitos nas vias sanguíneas (Matos & Matos, 1995). Em contrapartida, os monócitos são células grandes, maiores que os linfócitos, com citoplasma basofílico, formato esférico com irregularidades, núcleo pequeno com cromatina densa com ausência de nucléolo e chamados de células em trânsito no sangue periférico (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Thrall et al., 2007). Ademais, os monócitos possuem atividade fagocitária e ocorrem quando há reação inflamatória, consistindo em uma resposta imunológica que aumenta a sua importância para os mecanismos de defesa, além de possuírem habilidade citotóxica, ou seja, conseguem alterar o metabolismo celular; com isso, podem acelerar a atividade fagocítica de antígenos bacterianos (Thrall et al., 2007).

Os eosinófilos são menores e apresentam tamanhos diversos que dependem do tamanho dos grânulos no citoplasma e da quantidade; o citoplasma é rico em grânulos mais grosseiros — com cor rosa-alaranjado torna-se mais fácil sua identificação; o núcleo é arredondado com cromatina compactada (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004). São células mais presentes nos tecidos hematopoiético, mesentérico, submucosa intestinal, líquido peritoneal e brânquias (Tavares-Dias, Melo, Moraes & Moraes, 2002). Esses dados indicam que, provavelmente, o grau de estresse do piau cabeça-gorda e do cascudo é baixo, devido à ocorrência de células de defesa no tecido sanguíneo das espécies estudadas.

Dessa forma, a avaliação da hematologia é uma ferramenta importante para o entendimento da sanidade dos peixes e dos recursos naturais disponíveis no PNCM. Para *L. fasciatus* e *H. pusarum*, esses resultados devem ser complementados por uma análise química (parâmetros orgânicos e inorgânicos) das cachoeiras de São Romão e da Prata para avaliar o grau de impacto

que essa região vem sofrendo ao longo do processo de expansão ecoturística e de possíveis empreendimentos de influência direta e indireta no parque.

REFERÊNCIAS

ADEDEJI, O. B., ADEYEMO, O. K. & AGBEDE, S. A. (2009). Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Afri. J. Biotech.*, 8(16): 3940-3946. <http://www.academicjournals.org/AJB>

ADHIKARI, S., SARKAR, B., CHATTERJEE, A., MAHAPATRA, C. T. & AYYAPPAN, S. (2004). Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost; *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 58: 220-6. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.12.003>

AGOSTINHO, A. A., G. BARBIERI, J. R. VERANI, & N. S. HAHN. (1990). Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassis, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR. *Ciênc. Cult.*, 42: 711-714

AYLLÓN, F. & GARCIA-VAZQUEZ, E. (2001). Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 49: 221-5. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2065>

BARKHORDAR, M., VALIZADEH, R., BAGHERI, T., TAHERIMIRGHAED, A. & HEDAYATI, A. (2013). Detection of heavy metal biomarkers for study of fishes. *J. Nov. Appl. Sci.*, 2: 180-7.

BRASIL. (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, Seção 1: 1-23.

_____. (2011). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília.

_____. (2005). Decreto de 12 de dezembro de 2005. Decreta a criação do Parque Nacional da Chapada das Mesas, nos Municípios de Carolina, Riachão e Estreito, no Estado do Maranhão, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília.

_____. (2000). Lei Nº 9.985, de 18 de Julho de 2000. Institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências.. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília.

CARVALHO-NETA, R. N. F., PINHEIRO-SOUSA, D. B., MACÊDO SOBRINHO, I. C., HORTON, E. Y., ALMEIDA, Z. S., TCHAICKA, L. & SOUSA, A. L. (2015). Genotoxic and hematological parameters in *Collossoma macropomum* (Pisces, Serrasalminidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected area in northeastern Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22: 15994-6003. <http://doi.org/10.1007/s11356-015-4748-4>

DITTMAR, E., LUNA, H. S. & CAETANO FILHO, R. A. C. (2010). Associação entre o

desenvolvimento gonadal e a frequência de micronúcleos em eritrócitos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*). *Rev. Agrarian*, Dourados, 3(8): 152-61.

FENECH, M., CROTT, J., TURNER, J., & BROWN, S. (1999). Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagen.*, 14(6): 605-612.

FRENZILLI, G., SCARCELLI, V., DEL BARGA, I., NIGRO, M., FÖRLIN, L., BOLOGNESI, C. & STURVE, J. (2004). DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour. *Mutat. Res.*, 552:187-195. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.018>

FRANÇA, J. G., RANZANI-PAIVA, M. J. T., LOMBARDI, J. V., CARVALHO, S. & SERIANI, R. (2007). Toxicidade crônica do cloreto de mercúrio (HgCl₂) associado ao selênio, através do estudo hematológico em tilápia *Oreochromis niloticus*. *Bioikos*, 21: 11-9.

GALVAN, G. L. (2011). *Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino de pesquisas utilizando como bioindicador o peixe Astyanax altiparanae (Characidae)* [Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná.

HEDDLE, J. A., HITE, M., IRKHART, B., MACGREGOR, J. T. E. & SALAMONE, M. F. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. *Mutat. Res.*, 123: 61-118. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90047-7)

HINTON, D. E., BAUMANN, P. C., GARDNER, G. R., HAWKINS, W. E., HENDRICKS, J. D., MURCHELANO, R. A. & OKIHIRO, M. S. (1992). Histopathological biomarkers. In: R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle & H. L. Bergman Jr. (Eds.). *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress* (pp.155-196). Lewis: editora CRC Press.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA) (2007). *Plano operativo de prevenção e combate aos incêndios florestais do Parque Nacional das Chapadas das Mesas*. Carolina: IBAMA.

MARQUES, A. R. (2012). *Saberes geográficos integrados aos estudos territoriais sob a ótica da implantação do Parque Nacional da Chapa das Mesas, sertão de Carolina* [Tese de Doutorado em Geografia]. Presidente Prudente (SP): Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

MATOS, M. S. & MATOS, P. F. de (1995). *Laboratório Clínico Médico-Veterinário*. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 238 p.

MAZZEO, D. E. C. & MARIN-MORALES, M. A. (2015). Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nuclear alterations. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22(13): 9796-806. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4134-2>

NIKOLSKI, G. V. (1969). *Theory of fish population dynamics*. Edimburgo: Oliver and Boyd. 323 p.

OBA, E. T., MARIANO, W. S. & SANTOS, L. R. B. S. (2009). Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: EMBRAPA Amapá. *Manejo e Sanidade de*

peixes em cultivo (pp. 226-247). Brasil: Embrapa Amapá.

PINHEIRO-SOUSA, D. B. (2015). *Um modelo preditivo baseado em biomarcadores aplicado a uma área protegida* [Dissertação de Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca]. São Luís: Universidade Estadual do Maranhão.

PINHEIRO-SOUSA, D. B. P., ALMEIDA, Z. S. & CARVALHO-NETA, R. N. F. (2013). Integrated analysis of two biomarkers in *Sciades herzbergii* (Ariidae, Siluriformes) to assess the environmental impact at São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil. *Latin Am. J. Aquatic Res.*, 41(2): 305-12. <http://doi.org/10.3856/vol41-issue2-fulltext-9>

POLARD, T., JEAN, S., MERLINA, G., LAPLANCHE, C., PINELLI, E. & GAUTHIER, L. (2011). Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74: 144-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.005>

RANZANI-PAIVA, M. T. J. & SILVA-SOUSA, A. T. (2004). Hematologia de Peixes Brasileiros. In: M. J. T. Ranzani-Paiva, R. M. Takemoto, M. L. A. P. Lizama. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela.

RIVERO, C. L. G. (2007) *Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil* [Dissertação em Patologia Molecular] Brasília: Universidade de Brasília.

SATAKE, F., PÁDUA, S. B. & ISHIKAWA, M. M. (2009). Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: M. Tavares-Dias (Ed.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo* (pp. 330-345). Macapá: Embrapa Amapá.

SATO, Y., CARDOSO, E. L., GODINHO, A. L. & GODINHO, H. P. (1996). Hypophysation of the anostomid fish white-piau, *Schizodon knerii* from the rio São Francisco basin. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, 48(Supl. 1): 63-70.

SILVA, G., CANOVA, T., GUIMARÃES, A. T. B. & ADAM, M. (2008). Influência sazonal sobre a frequência de micronúcleos e edemas branquiais em *Scleromistax barbatus* (Siluriformes: Callychthidae) coletados em rios da Serra do Mar - PR, Brasil. *RUBS*, 1(3): 84-90.

SINGH, N. & SRIVASTAVA, A. (2010). Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. *Ecotoxicol.*, 19: 838-54. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0465-4>

TAVARES, E. F., GODINHO, H. P. (1994). Ciclo reprodutivo do peixe piau-gordura (*Leporinus piau* Fowler, 1941) da represa de Três Marias, rio São Francisco. *Rev. Ceres*, Viçosa, 41(233): 28-35.

TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F. R. (2004). *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Eletrônica e Arte Final. 144 p.

TAVARES-DIAS, M., MELO, J. F. B., MORAES, G. & MORAES, F. R. (2002). Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pimelodidae). *Ciênc. Rural*, Santa Maria, 32(4): 693-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000400024>

THRALL, M. A., BAKER, D. C., CAMPBELL, T. W., DENICOLA, D., FETTMAN, M. J., LASSEN, E. D., REBAR, A. & WEISER, G. (2007); *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: Roca.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1993). *41st Report of the Joint Expert Committee on Food Additives*. Estados Unidos: JEFCA.

UDROIU, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicolog.*, 79: 201-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>