

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**JULIANA MOREIRA MENDONÇA GOMES**

**“ASPECTOS GENOTÓXICOS INDUZIDOS POR CÁDMIO EM  
*Oreochromis niloticus* (PISCES: CICHLIDAE) POR  
MICROSCOPIA DE LUZ E CITOMETRIA DE FLUXO”**

**BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS**

**2012**

**JULIANA MOREIRA MENDONÇA GOMES**

**“ASPECTOS GENOTÓXICOS INDUZIDOS POR CÁDMIO EM  
*Oreochromis niloticus* (PISCES: CICHLIDAE) POR  
MICROSCOPIA DE LUZ E CITOMETRIA DE FLUXO”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. José Dias Corrêa Júnior

**BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS**

**2012**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interações Físico-Químicas e da Reprodução Animal e Laboratório de Biologia das Interações Celulares do Departamento de Morfologia ICB / UFMG, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Dedico esta dissertação ao Bruno, meus  
pais e familiares e aos meus amigos,  
companheiros de todas as horas...

## **Agradecimentos**

À Deus, por guiar meus caminhos;

Aos meus pais, irmãos e familiares, que sempre me incentivaram e ajudaram a enfrentar os desafios;

Ao meu orientador Dr. José Dias Corrêa Junior, pelo incentivo à busca do conhecimento e aprimoramento profissional;

À colaboradora deste projeto, Dra. Walderez Ornelas Dutra e sua equipe de trabalho, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores Dr. Antônio Carlos Santana Castro e Dr. José Carlos Nogueira, que nos proporcionam momentos culturais bastante agradáveis em nosso laboratório;

A nossa equipe de trabalho, Betânia, Heder, Kelly e Marcela, pela dedicação, auxílio nos experimentos e por proporcionarem momentos tão agradáveis que tornaram as dificuldades do dia a dia mais leves;

Aos colegas Ana Cristina, Amanda, Pedro e Nathalia, pelo auxílio nos experimentos iniciais;

À Samira e colegas do Laboratório de Biologia Celular (Departamento de Morfologia da UFMG), que gentilmente colaboraram em diversas etapas deste projeto;

Aos colegas (alunos, funcionários e professores) do curso de pós-graduação em Biologia Celular;

Ao Bruno, por me acompanhar nestes anos, ouvindo os desabafos e diminuindo o peso desta conquista.

“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original”  
(Albert Einstein)

## Resumo

O aumento constante de xenobióticos no meio ambiente tem preocupado os órgãos de saúde pública devido aos danos sociais e econômicos causados pelos seus efeitos deletérios. Algumas substâncias genotóxicas como o cádmio danificam as células alterando suas expressões gênicas e gerando imperfeição nos processos de replicação e reparo cromossômico. A quantificação dos efeitos genotóxicos é considerada um excelente marcador de exposição. Neste trabalho utilizamos as técnicas de microscopia de luz e citometria de fluxo para avaliar as alterações morfológicas em núcleos eritrocíticos, bem como a proporção e integridade das populações eritrocíticas, granulocíticas, linfocíticas e trombocíticas de tilápias expostas ao cádmio. Animais expostos a concentrações de 0,25- e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O e controles foram analisados nos períodos de 48, 96 e 144 horas. Nossos resultados mostraram aumento no número das alterações celulares tempo e dose dependente, bem como correlações positivas entre as alterações morfológicas nucleares e alterações na integridade da membrana das células. As técnicas foram adequadas na avaliação das alterações indicando suas aplicações em programas de monitoramento ambiental.

Palavras-chave. Genotoxicidade, integridade celular, depuração, anormalidades nucleares, citometria de fluxo, iodeto de propídeo.

## Abstract

The steady increase of xenobiotics in the environment has been a matter of concern to public health agencies due to social and economic damage caused by its deleterious effects. Genotoxic substances such as cadmium cause cell damage altering their gene expression, generating imperfections in the processes of replication and repair processes. The quantification of the genotoxic effects is considered an excellent marker of exposure. In this work we used the techniques of light microscopy and flow cytometry to assess the erythrocytic morphological abnormalities in nuclei, and the proportions and integrity of populations' erythrocytes, granulocytes, and lymphocytes / thrombocytes of tilapia exposed to cadmium. Animals exposed to concentrations of 0.25-, 2.5 mg.L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O and controls were analyzed for periods of 48, 96 and 144 hours. Our results showed an increase time and dose dependent in the number of cellular alterations, addition to positive correlations between the nuclear morphological abnormalities and cell membrane integrity. The techniques were adequate in the assessment of the changes indicating their applications in environmental monitoring programs.

**Keywords.** Genotoxicity, cell integrity, depuration, nuclear abnormalities, flow cytometry, propidium iodide.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Tilápia *Oreochromis niloticus* \_\_\_\_\_ 4
- Figura 2:** Microscopia de luz das alterações nucleares eritrocíticas \_\_\_\_\_ 12
- Figura 3:** Esquema representativo do ensaio de exposição ao cádmio \_\_\_\_\_ 21
- Figura 4:** Desenho esquemático da extração de sangue em peixes utilizando o método de punção caudal \_\_\_\_\_ 23
- Figura 5:** Desenho esquemático do processamento das amostras sanguíneas para a determinação das populações sanguíneas por citometria de fluxo \_\_\_\_\_ 25
- Figura 6:** Micrografias de luz de células sanguíneas de *O. niloticus*, evidenciando as alterações nucleares encontradas: bolha nuclear, broto nuclear, condensação nuclear, fissura nuclear, núcleo lobado, micronúcleo e vacuolização nuclear. \_\_\_\_\_ 29
- Figura 7:** Gráficos mostrando a ocorrência percentual de cada alteração nuclear eritrocítica em *O. niloticus* expostos ao cádmio \_\_\_\_\_ 30
- Figura 8:** Gráficos mostrando as frequências das alterações nucleares em eritrócitos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 31
- Figura 9:** Gráficos demonstrativos da influência das alterações nucleares nos resultados de frequências de alterações nucleares totais \_\_\_\_\_ 35
- Figura 10:** Determinação das populações sanguíneas (eritrócitos, granulócitos, linfócitos e trombócitos) por citometria de fluxo \_\_\_\_\_ 37
- Figura 11:** Gráfico de citometria de fluxo mostrando a distribuição das populações sanguíneas de *O. niloticus* \_\_\_\_\_ 38
- Figura 12:** Gráficos demonstrando frequências populacionais de eritrócitos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 39
- Figura 13:** Gráficos demonstrando frequências populacionais de granulócitos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 40
- Figura 14:** Gráficos demonstrando frequências populacionais de linfócitos / trombócitos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 41
- Figura 15:** Gráficos demonstrando percentual de eritrócitos Pi positivos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 42

**Figura 16:** Histogramas representativos de eritrócitos Pi positivos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 43

**Figura 17:** Gráficos demonstrando percentual de granulócitos Pi positivos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 44

**Figura 18:** Histogramas representativos de granulócitos Pi positivos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 45

**Figura 19:** Gráficos demonstrando percentual de linfócitos / trombócitos Pi positivos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 46

**Figura 20:** Histogramas representativos de linfócitos / trombócitos Pi positivos de animais controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 46

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Parâmetros físico-químicos (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e amônia) dos tanques controles e expostos a diferentes concentrações de cádmio ao longo dos tempos \_\_\_\_\_ 28

**Tabela 2:** Análise da influência de cada alteração nuclear nos resultados de frequência total das alterações nucleares eritrocíticas dentro de cada tempo nas diferentes concentrações \_\_\_\_\_ 33

**Tabela 3:** Análise da influência de cada alteração nuclear nos resultados de frequência total das alterações nucleares eritrocíticas dentro de cada concentração nos diferentes tempos \_\_\_\_\_ 34

**Tabela 4:** Correlações das alterações nucleares eritrocíticas e alterações na permeabilidade da membrana de eritrócitos do grupo Cd-2,5 no tempo de 144 horas \_\_\_\_\_ 47

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$  – micrômetro

EGC – células granulocíticas eosinofílicas

ANEs – alterações nucleares em eritrócitos

BO – bolha nuclear

BR – broto nuclear

FI – fissura nuclear

CO – condensação nuclear

LO – núcleo lobado

MN – micronúcleo

VA – vacuolização nuclear

AN – alterações nucleares

$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – cloreto de cádmio hidratado

Ct – grupo controle

Cd-0,25 –  $0,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Cd-2,5 –  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Pi – iodeto de propídeo

SF – sangue fixado

SNF – sangue não fixado

FSC – forward scatter = tamanho

SSC – side scatter = granulosidade

ppm – partícula por milhão

FAO/OMS – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação  
/ Organização Mundial da Saúde

## ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. Geral	1
2. Genotoxicidade	1
3. Peixes	2
4. Modelo animal de estudo	3
5. Indutor genotóxico (Cádmio)	5
5.1. Mecanismos genotóxicos do cádmio	7
6. Células sanguíneas de peixes	9
6.1. Eritrócitos	10
6.1.1. Alterações nos núcleos eritrocíticos	11
6.2. Leucócitos e Trombócitos	13
7. Citometria de fluxo	16
<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
1. Objetivo geral	19
2. Objetivos específicos	19
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
1. Animais	20
2. Ensaio de exposição	20
3. Obtenção de amostra sanguínea	22
4. Caracterização das alterações morfológicas nucleares	23
5. Determinação das populações sanguíneas por citometria de fluxo	23
6. Frequências populacionais sanguíneas por citometria de fluxo	25
7. Aquisição e análises por citometria de fluxo	26
8. Análises estatísticas	26
<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
1. Parâmetros físico-químicos	28
2. Animais e biometria	28
3. Alterações morfológicas nucleares	28
4. Frequências das alterações nucleares eritrocíticas	29
5. Frequências totais das alterações nucleares eritrocíticas	31
6. Influências das alterações na frequência total	32
7. Determinação das populações sanguíneas por citometria de fluxo	35
8. Análise das frequências populacionais sanguíneas por citometria de fluxo	38
9. Análise das frequências de células Pi positivas das populações sanguíneas	41
10. Correlações entre alterações nucleares eritrocíticas e eritrócitos Pi positivos	47
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
1. Condições experimentais	48
2. Alterações nucleares em eritrócitos	49
3. Estudo das populações sanguíneas por citometria de fluxo	53
3.1. Determinação das populações sanguíneas	53
3.2. Análises das populações sanguíneas por citometria de fluxo	55

<b>CONCLUSÕES</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>61</b>

## **INTRODUÇÃO**

### **1. Geral**

A contaminação do ambiente aquático ocorre por numerosos agentes tóxicos que geralmente são produzidos por atividades industriais, agrícolas e domésticas resultantes do uso inadequado de recursos hídricos. O aporte crescente de xenobióticos (compostos estranhos aos organismos) tem sido relacionado principalmente ao crescimento populacional e ao avanço tecnológico que resulta na liberação e geração de produtos que constituem os resíduos industriais e domésticos. Tal fato vem contribuindo para a redução da qualidade dos diversos compartimentos ambientais (água, sedimento, ar, solo), bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que neles habitam (CAJARAVILLE et al., 2000). Segundo Lucarelli (2006), entre os poluentes mais prejudiciais ao ecossistema estão os metais pesados, as radiações e os compostos orgânicos, tais como pesticidas e drogas (ATSDR 2008, DUARTE e PASQUAL, 2000). Estes agentes também apresentam particularmente a possibilidade de agirem como elementos genotóxicos. (PACHECCO et al. 1998; AYYLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000).

### **2. Genotoxicidade**

A genotoxicidade se refere à alteração na estrutura geral, na disposição dos cromossomos (clastogenicidade) ou nas sequências de pares de bases do DNA (mutagenicidade) por exposição a agentes tóxicos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O DNA é um componente celular importante na avaliação de toxicidade, tanto em organismos aquáticos quanto em organismos terrestres. A perda da

integridade do DNA pode induzir mutações, aberrações cromossômicas, defeitos congênitos, além de efeitos em longo prazo, tais como câncer e outros efeitos tóxicos irreversíveis (ROCCO et al., 2010).

Os danos cromossômicos se caracterizam como resultado de ineficiência do processo de reparo correto do DNA, sendo geralmente evidenciados durante a divisão celular e apresentam um índice de acumulação genotóxica. Estes efeitos podem ser medidos através da ocorrência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, alteração na replicação do DNA e formação de micronúcleos, bem como outras alterações nucleares (BOLOGNESI, 2003; MATSUMOTO et al., 2006).

Os mecanismos que podem gerar a genotoxicidade têm sido estudados através de bioensaios para a melhor compreensão da ação tóxica dos contaminantes. Os bioensaios são utilizados para a obtenção de dados e padronização de metodologias que permitem prever e/ou avaliar efeitos de um dado xenobionte em determinada concentração ou dosagem, de forma isolada, minimizando a influência de diferentes variáveis ambientais (RAMSDORF, 2007).

### **3. Peixes**

Os peixes são amplamente utilizados na avaliação do nível de toxicidade do ambiente aquático, uma vez que descargas industriais e domésticas são responsáveis por altas concentrações de substâncias tóxicas nesse ambiente. Além disso, apresentam respostas similares à dos grandes vertebrados, podendo assim ser utilizados no estudo de agentes tóxicos com potencial carcinogênico e teratogênico para seres humanos. A utilização dos peixes

como organismos sentinela pode indicar o potencial de exposição das populações humanas a genotóxicos químicos e também estão entre os maiores veículos de transferência de contaminantes para humanos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Devido a sua capacidade de metabolizar xenobióticos e acumular poluentes, os peixes representam importantes sistemas de monitoramento na avaliação de genotoxicidade aquática gerada principalmente por metais pesados (BALCH et al., 1995; GRISOLIA e CORDEIRO, 2000; METCALFE et al., 1990; MINISSI et al., 1996; RAJAGURU et al., 2003). Contudo, os peixes não estão isentos dos danos da poluição, pois alguns estudos laboratoriais e de campo tem relatado correlação positiva entre poluentes genotóxicos e o declínio das populações de peixes (CHEN e WHITE, 2004; KEITER et al., 2006).

#### **4. Modelo animal de estudo**

*Oreochromis niloticus*, popularmente conhecido por tilápia do Nilo foi a espécie escolhida para a execução deste trabalho. A tilápia é natural da África e foi introduzida no Brasil em 1971 (CASTAGNOLLI, 1992).

As tilápias adultas têm predominantemente dietas vegetarianas, embora possam ingerir uma ampla variedade de alimentos, incluindo, plânctons, organismos bênticos, invertebrados aquáticos, larvas de peixes, detritos e matéria orgânica em decomposição. Especialmente a espécie *O. niloticus* comumente se alimenta de fitoplânctons e detritos (LIM e WEBSTER, 2006). Portanto, estes animais podem adquirir substâncias tóxicas dissolvidas em água, bem como adquiri-las em sedimentos.

A maturação sexual da tilápia pode ser estimada de acordo com sua idade e peso. Para a tilápia do Nilo, a maturação ocorre por volta dos 6 meses de idade e com um peso aproximado de 40 gramas (LIM e WEBSTER, 2006).



**Figura 1:** Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Encontrado no site <http://blog.agriculture.ph/category/aquaculture/page/5>, acessado em 17 de janeiro de 2012.

A tilápia é uma espécie importante em bioensaios laboratoriais, pois apresenta alta prolificidade, resistência a muitas doenças (BENTSEN et al., 1998), crescimento rápido e rusticidade (HAYASHI et al., 1999). Adapta-se facilmente a ambientes lênticos e tolera grandes variações de temperatura (18 a 35°C), baixo nível de oxigênio dissolvido (1,2 mg.L<sup>-1</sup>) (LUCARELLI, 2006; LIM e WEBSTER, 2006) e alta concentração de amônia na água (1 mg.L<sup>-1</sup>) (POPMA e PHELPS, 1998; LIM e WEBSTER, 2006). Além disso, é comercialmente muito importante no sudeste do Brasil, e embora seja uma espécie de água doce, também pode ser encontrada em água salobra em

estuários do todo mundo (VIJAYAN et al., 1996). Como bioindicadora ambiental, apresenta considerável relevância, pois além de fácil adaptação a novos ambientes, possui distribuição generalizada e responde bem aos produtos químicos (VIJAYAN et al., 1996; LINDE-ARIAS et al., 2008).

## **5. Indutor genotóxico (cádmio)**

O cádmio é amplamente estudado devido a sua característica de poluente ambiental recorrente (ATSDR, 2008), já caracterizado como um elemento que apresenta efeitos adversos à saúde humana (LUCARELLI, 2006). Encontra-se como um dos elementos-traço mais estudados em toxicologia na atualidade, devido ao aumento significativo da sua concentração no ambiente, resultante do acúmulo de resíduos industriais e domésticos. (WRIGHT e WELBOURN, 1994; GOERING et al., 1995). Somado a este fato, o caráter persistente deste elemento (não sofre degradação química ou física) e a sua conseqüente acumulação nos organismos, lhe confere um significado ecológico importante (JENSEN e BRO-RASIRIUSSEN, 1992; ALAZEMI et al., 1996). Além disso, é um poluente particularmente perigoso devido a sua alta toxicidade e grande solubilidade em água (CELIK et al., 2007).

O cádmio é encontrado naturalmente na crosta da terra e frequentemente pode ser lançado na atmosfera através de atividades vulcânicas, incêndios florestais e transportes de partículas do solo pelo vento (FILIPÍČ, 2011). Além de ser encontrado naturalmente, este elemento possui uma larga produção mundial estimada em 20.000 toneladas em 2005. Esta produção é empregada na fabricação de pigmentos, tintas (como estabilizador), soldagens e baterias (Ni-Cd) (JOSEPH, 2009) que podem ser consideradas

como fonte antropogénica de contaminação ambiental decorrente do refino e uso de metais, tais como cobre e níquel, queima de combustíveis fósseis e resíduos de fertilizantes fosfatados (FILIPÍČ, 2011).

A exposição ocupacional tem sido relatada em trabalhadores de fundições de metais não ferrosos, na produção e processamento de cádmio e na reciclagem de lixo eletrônico. A exposição não ocupacional em humanos ocorre principalmente através do cigarro, que contém relativamente altas concentrações desse elemento (FILIPÍČ, 2011).

O cádmio pode estar presente no ar, na água e nos alimentos. A concentração de cádmio no ar atmosférico e na água é geralmente baixa, contribuindo com uma porcentagem muito pequena da dose total absorvida pelo organismo, sendo principalmente registrada em regiões industriais. A maior fonte de contaminação é através dos alimentos. O nível de exposição depende do tipo de alimento e da taxa de contaminação ambiental onde foi gerado. Segundo Järup e Akesson, (2009) o consumo de cádmio nos alimentos varia entre 8 e 25  $\mu\text{g}$  por dia e de acordo com EPA, a concentração de 0,005  $\text{mg.L}^{-1}$  de cádmio em alimentos e água não deveria causar nenhum efeito adverso a saúde humana.

Embora alimentos a partir de plantas em geral possam apresentar uma maior concentração de cádmio, outros alimentos como carne, ovos, produtos lácteos e peixes representam uma possível fonte de acúmulo desse metal em humanos (JÄRUP e AKESSON, 2009).

### **5.1. Mecanismos genotóxicos induzidos por cádmio**

Os efeitos genotóxicos e carcinogênicos do cádmio têm sido identificados pela capacidade interativa deste metal com DNA e proteínas. Esta interação promove a inibição da replicação e reparo de DNA, atuando na diminuição da fidelidade das DNAs polimerases (ZABOUR et al., 1981; HARTIWUIG, 1994). Além dos efeitos genotóxicos diretos, efeitos indiretos estão relacionados ao cádmio, como por exemplo, a alteração da homeostase do cálcio das células, interferindo assim na expressão de certos genes funcionais e em vias transcricionais (BEYERSMANN e HECHTENBERG, 1997).

Alguns efeitos do cádmio têm sido relatados em humanos, como tumores nos testículos, pulmões, próstata e no sistema hematopoiético (WAALKES e REHM, 1994), além de ocorrências de lesões renais irreversíveis, osteoporose, enfisema não-hipertrófico, anemia, eosinofilia, insônia e rinite.

Na exposição crônica a este metal, o rim é o órgão considerado mais sensível ao contaminante (WHO, 1992). Recentemente, o Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos para Alimentos (JECFA) estabeleceu uma adição mensal tolerável de cádmio de 25 µg/kg de peso corporal o que corresponde a uma adição semanal de 5,8 µg/kg (FILIPICĚ, 2011).

Os efeitos da exposição ao cádmio em peixes têm sido investigados ao nível morfológico e bioquímico em diferentes espécies (PRATAP e WENDELAAR-BONGA, 1993; WONG e WONG, 2000; GARCIA-SANTOS et al., 2007). Os peixes tendem a adquirir este contaminante a partir da água e / ou alimentos, e o acumulam em seus tecidos. Este acúmulo, ao nível individual

pode levar à redução da sobrevivência, do crescimento e da reprodução (HANSEN et al., 2002; MIGLIARINE et al., 2005).

Estudos recentes têm avaliado respostas enzimáticas dos peixes ao cádmio, sendo relatada por Jebali et al. (2006) a redução da atividade da acetilcolinesterase no peixe *Seriola dumerilli*, e por Roméo et al. (2000) a inibição da atividade da catalase. No entanto, o indicador mais conhecido de exposição ao metal é a indução de metalotioneínas que são proteínas ricas em cisteína (23 - 33%) de baixo peso molecular responsáveis por proteger o organismo contra os efeitos dos metais. Estas proteínas possuem em seus grupos sulfidril de alta afinidade para ligar e imobilizar uma grande variedade de metais, principalmente o cádmio (ROESIJADI, 1996; VAN DER OOST et al., 2003).

A exposição ao cádmio também envolve dano oxidativo às membranas celulares, pela peroxidação da membrana lipídica e pela alteração da capacidade antioxidativa das células (HUSSAINT et al., 1987; SARKAR et al., 1994, 1995). Os ácidos graxos insaturados presentes nas membranas (fosfolipídeos, glicolipídeos e esteróis) e as proteínas transmembranas que contêm aminoácidos oxidáveis são suscetíveis aos danos causados pelos radicais livres (TAPPEL, 1973). A peroxidação de lipídeos pode desestabilizar a membrana, causando alterações na fluidez e permeabilidade, modificações no transporte de íons e inibição dos processos metabólicos (NIGAM e SCHEWE, 2000).

Alterações patológicas podem ocorrer nos tecidos responsáveis pela regulação de íons sob efeito do cádmio (WONG e WONG, 2000), gerando distúrbios como a tumefação do epitélio e de células de cloreto nas brânquias,

hiperplasia e hipertrofia, pois as brânquias representam um órgão chave para a ação dos poluentes existentes no meio aquático (GARCIA-SANTOS et al., 2007). Entretanto, segundo Wu et al. (2007), as brânquias são um órgão alvo temporário de acúmulo de cádmio, sendo este transferido via sistema circulatório ou sistema enterohepático para órgãos digestivos, tais como rim e fígado. O rim é um importante órgão para a regulação iônica em peixes e segundo Thophon et al. (2003), o cádmio pode causar degeneração, necrose e vacuolização nas células dos túbulos renais. No fígado têm sido observados vacuolização de hepatócitos, edema celular e congestão dos vasos sanguíneos (DYK, 2007). O fígado tem um papel chave no metabolismo e subsequente excreção de xenobiontes, portanto, é de adicional interesse na avaliação de impactos ambientais (BERNET et al., 1999).

O cádmio tem demonstrado, também, ser um metal genotóxico (BEYERSMANN e HECHTENBERG, 1997; FAVERNEY et al., 2001; WAISBERG et al., 2003; FILIPIČ e HEI, 2004; HARTWIG, 1994; VALVERDE et al., 2001), inclusive em eritrócitos de peixes, gerando núcleos alterados (SUMMAK et al. 2010; BARBOSA et al., 2010). Apesar de nos peixes ósseos, o principal órgão hematopoiético ser o rim cranial, ensaios de micronúcleos de eritrócitos do sangue periférico foram eleitos por diversos autores como o “endpoint” na avaliação de genotoxicidade (KLIGERMAN et al., 1975; HOOFTMAN e RAAT, 1982).

## **6. Células sanguíneas de peixes**

As células sanguíneas têm sido consideradas relevantes para análise de aspectos genotóxicos, uma vez que elas refletem o estado de saúde geral do

indivíduo. Vários trabalhos têm dado especial atenção à utilização de sangue de peixes, já que suas células vermelhas são nucleadas e, portanto, adequadas a análises de genotoxicidade (CASTAÑO et al., 1998; ÇAVAS et al., 2005; COSTA e COSTA, 2007; COSTA et al., 2011; ANSARI et al., 2011; TALAPATRA et al., 2010).

### **6.1. Eritrócitos**

De muitas maneiras, os glóbulos vermelhos (eritrócitos) dos peixes diferem dos de mamíferos. Os eritrócitos dos mamíferos eliminam seus núcleos antes de entrarem na circulação. Nos peixes os núcleos permanecem dentro da célula por toda vida celular. Nos eritrócitos nucleados ocorrem ribossomos (SEKHON e BEAMS, 1969; LANE e THARP, 1980; LANE et al., 1982), o que lhes permite sintetizar proteínas como a hemoglobina (KEEN et al., 1989; SPECKNER et al., 1989). As mitocôndrias também são mantidas, funcionais e com taxas metabólicas mais elevadas que em eritrócitos anucleados de mamíferos (BOUTILIER e FERGUSON, 1989). Estes eritrócitos nucleados passam por diversas transformações durante seu tempo de vida de 4 a 6 meses, incluindo a perda de mitocôndrias (LANE, 1984; KEEN et al., 1989; SPECKNER et al., 1989; LUND et al., 2000; PHILLIPS et al., 2000; TIANO et al., 2000, 2001).

As membranas biológicas dos peixes são sensíveis ao estresse oxidativo, uma vez que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, os quais são extremamente sensíveis à oxidação e podem direta ou indiretamente causar muitas doenças aos peixes (SLATER, 1982; SAKAI et al., 1989; ITO et al., 1999, 2000; MAI, et al., 2010). Os glóbulos vermelhos estão

constantemente expostos a espécies reativas de oxigênio (ROS), por ter a função de transporte de oxigênio. Apesar de apresentar sistema de reparo contra o estresse oxidativo, a exposição constante pode levar ao acúmulo de danos tais como o envelhecimento e declínio do sistema de reparos (NAGASAKA, 2004).

### 6.1.1. Alterações nos núcleos de eritrócitos

Em peixes existem vários tipos de lesões nucleares cuja origem e mecanismo de formação não estão muito bem elucidados. A maioria das pesquisas abordando a origem dessas anormalidades têm sido direcionadas aos micronúcleos (OSMAN et al., 2010).

Além das análises de micronúcleo, outras lesões nucleares têm sido observadas, sugerindo que estas alterações devem ser consideradas juntamente com o micronúcleo (SCHRODER, 1970; TOLBERT et al., 1991; 1992; FENECH et al., 1999). Assim como o micronúcleo, a ocorrência de tais alterações tem sido relacionada à falha na divisão celular, processos de morte, genotoxicidade ou mutagênese (FENECH, 2000).

Os critérios para identificação das alterações nucleares em eritrócitos foram baseados nas características citadas por Grisolia et al. (2009) e Carrasco et al. (1990), como descrito abaixo:

**Bolha Nuclear ou “Blebbed”:** pequena evaginação da membrana nuclear, aparentemente contendo eucromatina ou heterocromatina (Fig. 2A).

**Broto Nuclear:** núcleo apresentando pequena protuberância nuclear, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal (Fig. 2B).

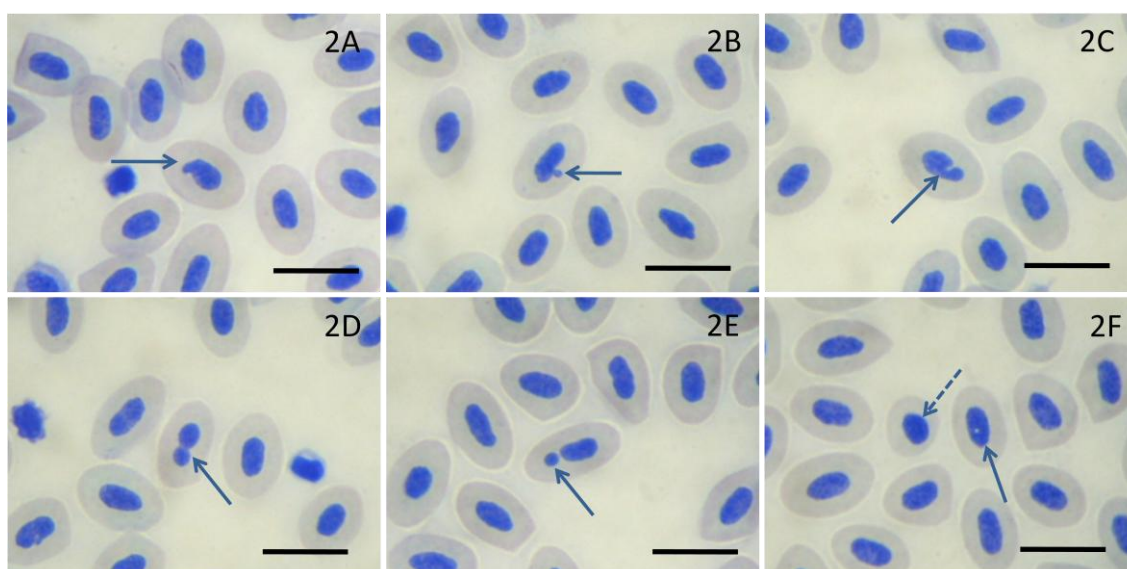
**Condensação Nuclear:** núcleo apresentando cromatina bastante condensada e citoplasma pouco escasso (Fig. 2F).

**Fissura Nuclear ou “Notched”:** núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável do núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear (Fig. 2C).

**Núcleo lobado ou “Lobed”:** núcleos que apresentam evaginações mais largas do que as descritas para a bolha nuclear. Sua estrutura poderá não ser tão definida como a anterior (Fig. 2D).

**Micronúcleo:** pequeno corpúsculo nuclear totalmente desconectado do núcleo principal, apresentando a mesma coloração da sua origem e não excedendo a um terço do diâmetro do núcleo principal (Fig. 2E).

**Vacuolização:** núcleos que apresentam uma região que se assemelhe a vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” se apresentam destituídos de qualquer material visível no seu interior (Fig. 2F).



**Figura 2.** Micrografia óptica mostrando as alterações nucleares. A, Bolha nuclear. B, Broto nuclear. C Fissura nuclear. D, Núcleo lobado. E, Micronúcleo e F, Vacuolização nuclear (seta) e Condensação nuclear (seta tracejada). (Barra = 10  $\mu$ m – Coloração May-Grunwald).

Os testes de micronúcleos são amplamente aplicados para avaliar impacto ambiental aquático (DE FLORA et al., 1993; MINISSI et al., 1996; SANCHEZ-GALAN et al., 1998; ERGENE et al., 2007). Os micronúcleos surgem a partir de fragmentos cromossômicos inteiros que não são incorporados nos núcleos das células filhas, durante a mitose (SCHMID, 1975).

A avaliação das frequências e percentuais de anomalias nucleares e de micronúcleos são ensaios muito utilizados para a investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em peixes (AL-SABTI, 1986). Nesses organismos, diversos tipos de lesões nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida (RAMSDORF, 2007). No caso dos micronúcleos acredita-se que sejam constituídos principalmente por fragmentos cromossômicos ou por cromossomos que apresentam retardo na migração durante a fase anáfase, que se detectam em células interfásicas mediante técnica simples de coloração, aparecendo no citoplasma como pequenos fragmentos basofílicos (PORTO et al., 2005).

## **6.2. Leucócitos e Trombócitos**

Os leucócitos de peixes têm sido classificados utilizando os mesmos critérios aplicados aos leucócitos de mamíferos. Alguns estudos dão suporte a esta classificação, mostrando semelhanças morfológicas e funcionais com células de mamíferos (GROFF e ZINKL, 1999; ZINKL et al., 1991). Entretanto, os leucócitos de peixes, diferentes dos de mamíferos, são geralmente encontrados na corrente sanguínea em diferentes estágios de maturação, tornando difícil a distinção de suas linhagens (HINE et al., 1987).

Os neutrófilos são células de defesa do organismo que são encontrados mais frequentemente nos rins, baço e sangue dos peixes, aumentando em número nas lesões inflamatórias (HAMDAMI et al., 1998; PASTORET et al., 1998). Portanto, parâmetros de neutrófilos funcionais de peixes também podem ser utilizados na avaliação do estado de saúde dos animais (LAMAS e ELLIS, 1994). A resposta inflamatória em peixes teleósteos inicia-se com um influxo de neutrófilos seguido por chegada tardia dos monócitos/macrófagos. A monocitopoiese em teleósteos geralmente ocorre no rim cranial e/ou baço. Ao migrar para os tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos que podem tornar-se estimulados com potencial fagocítico aumentado (ROWLEY, 1996).

Os monócitos são células importantes na resposta imune, produzem citocinas e são as células primárias na apresentação de antígenos em teleósteos (VALLEJO et al., 1992; SHOEMAKER et al., 1997). Destacam-se pela capacidade de ingerir material estranho ao organismo, como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos (FALCON, 2007).

Matsuyama e Lida (1999), verificaram o envolvimento da degranulação de eosinófilos na migração de neutrófilos em tilápia do Nilo. Suas características citoquímicas e seu envolvimento em reações patológicas sugerem que as células granulares eosinofílicas (EGCS) são análogas aos mastócitos de mamíferos (ELLIS, 1985; POWELL et al., 1991; POWELL et al., 1993; REITE, 1997). Mastócitos de mamíferos induzem a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais por liberação de

conteúdos granulares (MENG et al., 1995). Além disso, geram acúmulo de leucócitos após a degranulação, indicando que os fatores químicos de atração de leucócitos também são liberados ou produzidos pelas EGCS (REITE, 1997; REITE e EVERSON, 1994).

Os basófilos foram primeiramente descritos em humanos em 1879 por Paul Ehrlich. Estas células são encontradas em mamíferos, aves, répteis anfíbios e peixes (CANFIELD, 1998). Aparentemente, estas células são similares às de mamíferos, com exceção do núcleo que geralmente não é lobado somente em mamíferos (CANFIELD, 1998). Os basófilos são encontrados distribuídos pelo tecido conjuntivo, principalmente no trato gastrointestinal e nas brânquias. Em peixes, a função dessa célula não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que estas participam dos processos inflamatórios crônicos e da defesa celular. Estas células são encontradas na corrente sanguínea quando há infestação por parasitas. Os basófilos são considerados ausentes na maioria dos peixes (HINE, 1992) e em animais sadios são pouco numerosos (0-3% dos leucócitos periféricos) (MEAD, 1983).

Os linfócitos são células pequenas, exibem um grande núcleo central com manchas densas de heterocromatina. Possuem pouco citoplasma ao redor do núcleo, no qual estão contidos ribossomos, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (VÁZQUEZ e GUERRERO, 2007). No sistema imunológico de vertebrados estão envolvidas na resposta à inflamação, desempenhando papel em ambas as respostas, inata e adquirida (SHIGDAR et al., 2009).

Os trombócitos do sangue de peixes são células nucleadas e têm sido descritos como as células sanguíneas mais abundantes depois de eritrócitos,

entretanto, pouco foi revelado sobre suas características morfológicas e funcionais, uma vez que tem sido detectadas dificuldades na distinção entre linfócitos e trombócitos (IMAGAWA et al., 1989; UEDA et al., 1997). Em peixes, os trombócitos possuem diversas funções, atuando na redução da predisposição a infecções e na realização da fagocitose. Este tipo celular tem sido observado em uma elevada frequência no sangue circulante, em exsudatos inflamatórios e atividades fagocíticas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003).

A quantificação dos leucócitos no sangue é uma ferramenta indispensável na avaliação da saúde das espécies de mamíferos. A mesma abordagem tem sido utilizada para peixes, onde leucogramas são utilizados na avaliação de estresse e doenças desses animais (CLAUSS et al., 2008).

Poucos dados têm associado às avaliações morfológicas com técnicas de maior capacidade analítica. Ainda que os testes envolvidos na caracterização morfológica sejam bastante eficientes na determinação dos efeitos genotóxicos sob condições *in vitro* e *in vivo*, novas abordagens utilizando a citometria de fluxo têm contribuído muito na caracterização e quantificação das células, uma vez que trabalhos mostram alta correlação entre as análises morfológicas de microscopia de luz e as contagens por citometria de fluxo (KOHLPOTH et al., 1999).

## **7. Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo é um método sensível de análise que permite uma rápida avaliação multiparamétrica. As amostras são avaliadas por técnicas de medição qualitativa e quantitativa, onde a membrana plasmática, o citoplasma

e o núcleo podem ser analisados (CHILMONCZIK e MONGE, 1999). Vantagens do uso da citometria de fluxo na mensuração de características celulares têm sido relatadas por alguns autores, como o amplo número de células que podem ser analisadas em pequeno intervalo de tempo (usualmente centenas a milhares de células por segundo), além de poder ser usada para outros fins na avaliação da genotoxicidade celular (NUSSE e MARX, 1997).

Esta técnica tem sido utilizada em inúmeras abordagens em diferentes tipos celulares de diferentes organismos aquáticos, geralmente utilizando marcadores fluorescentes (KLIMOWICZ-BODYS et. al., 2011; SANDSROM et al., 2000). Células marcadas com moléculas fluorescentes têm sido utilizadas na avaliação de integridade da membrana celular, sendo o iodeto de propídeo (Pi) um dos marcadores mais utilizados (BUNTHOF et al., 1999).

O iodeto de propídeo (Pi) é um marcador amplamente utilizado para avaliar morte ou dano celular. Pois pode combinar com materiais genéticos de células que apresentam a permeabilidade da membrana comprometida. As células que possuem a membrana íntegra não são marcadas por Pi, uma vez que a membrana funciona como uma barreira à entrada deste marcador (DARZYNKIEWICZ et al., 1992;. VERMES et al., 1995; 2000).

Nagasaka et al. (2004) demonstrou que o estresse oxidativo afeta a permeabilidade de membrana das células vermelhas do sangue de peixes, e reduz sua fluidez. Associado a isso, o cádmio tem o estresse oxidativo como seu principal efeito (FILIPICĀ, 2011).

Portanto, a avaliação das células sanguíneas de peixes associando alterações nucleares e populacionais à morte ou dano das células, tem

importante relevância na determinação dos danos causados pelo cádmio a estes organismos.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos genotóxicos em células sanguíneas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) após 48, 96 e 144 horas de ensaio utilizando cádmio em duas diferentes concentrações, através de análises por microscopia de luz e citometria de fluxo.

#### 1.1. Objetivos específicos

- Descrever e quantificar as alterações genotóxicas em eritrócitos por microscopia de luz;
- Correlacionar as frequências dos diferentes tipos de alterações genotóxicas em eritrócitos com as concentrações e tempos de exposição e de depuração;
- Determinar a localização das populações sanguíneas por citometria de fluxo em *O. niloticus*;
- Quantificar as populações de células sanguíneas por citometria de fluxo, após ensaio genotóxico;
- Quantificar células Pi positivas nas diferentes populações sanguíneas de *O. niloticus* após ensaio genotóxico utilizando citometria de fluxo;

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

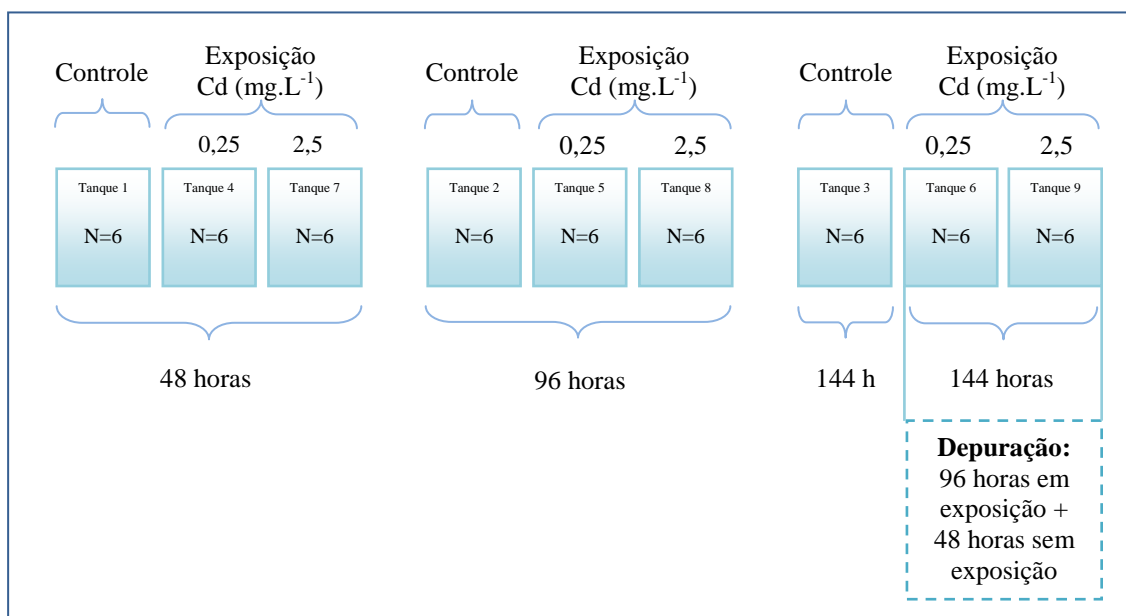
### **1. Animais**

Para o presente estudo foram utilizados 60 espécimes jovens não revertidos fornecidos pela empresa GM alevinos, Contagem – Minas Gerais. Os espécimes foram transferidos para o Biotério de Animais Silvestres de Departamento de Morfologia ICB-UFMG e aclimatados em tanques de plásticos (polipropileno e poliestileno desprovidos de Bisfenol-A, BPA, com dimensões 56,4 x 38,5 x 37,1 cm), contendo 40 litros de água da COPASA, dechlorada pela utilização de filtro de carvão ativado (Aqualar AP200). Estes tanques receberam aeração constante através do equipamento Big Air A420. Os animais foram mantidos por um período de aclimatização de quatro dias sem alimentação. As condições da qualidade da água foram monitoradas para o oxigênio dissolvido, temperatura, pH e concentração de amônia utilizando o equipamento YSI 55 para oxigênio dissolvido, Corning 430 (temperatura e pH) e o kit Labcon Test para amônia. Todos os tanques receberam troca de 50% do seu volume de água limpa conforme citado acima, a cada 48 horas.

### **2. Ensaio de exposição**

Após a aclimatação, 54 animais foram distribuídos de forma randômica em nove tanques plásticos (contendo 40 litros de água). Em cada tanque foram acondicionados seis animais. Seis tanques receberam o contaminante, cádmio, em duas concentrações diferentes. Em três tanques foram adicionados 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (Cd-0,25) e, em outros três, a concentração de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (Cd-2,5). Nos três tanques destinados ao controle experimental

(Ct), nenhuma concentração contendo sais de cádmio foi aplicada. Ao término dos períodos de 48 e 96 horas, os animais de um aquário de cada concentração e de um aquário do grupo controle foram retirados e submetidos aos processamentos subsequentes. Após 96 horas de exposição, os animais dos tanques remanescentes foram transferidos para tanques contendo água da COPASA, declorada e sem adição de  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , para a obtenção do chamado grupo de depuração ou “retorno”. Nestes tanques, estes animais foram mantidos por 48 horas. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos sem alimentação e 50% da água dos tanques foram renovadas a cada 48 horas para manter as condições dos aquários ideais para o experimento. Nos tanques expostos ao cádmio, após a troca de água, a concentração de cádmio foi ajustada para a progressão do experimento. Um resumo do ensaio de exposição está apresentado na figura 3.



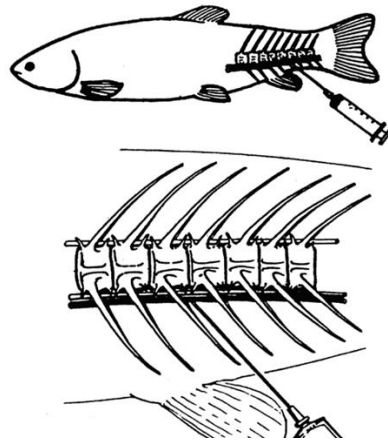
**Figura 3:** Esquema do desenho experimental do ensaio de exposição utilizado na obtenção dos efeitos genotóxicos causados por cádmio sobre *O. niloticus*.

### **3. Obtenção de amostras sanguíneas do ensaio de exposição**

Após a captura, os animais foram anestesiados em banho de imersão contendo  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  de Eugenol em água, segundo Vidal et al. (2008). Imediatamente após cada procedimento de anestesia, parte do sangue destes animais foi recolhido para o processamento por microscopia de luz e citometria de fluxo e, em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia através da transecção cranial. O projeto de pesquisa foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e foi aprovado sob o número 241/10 (ANEXO).

O sangue periférico foi retirado por punção da veia caudal (Fig. 4), utilizando uma seringa contendo o anticoagulante, EDTA – ethylene diaminetetra acetate 10%, pH 6,8, de acordo com o método modificado de Hooftman e Raat (1982), descrito para eritrócitos de peixes.

Parte do material coletado foi utilizado para a imediata confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo (4 lâminas por animal) visando à caracterização histológica por microscopia de luz das alterações nucleares e parte foi separada para as subseqüentes obtenções por citometria de fluxo dos percentuais das linhagens eritrocíticas, leucocíticas e trombocíticas, bem como determinação das frequências de células marcadas por iodeto de propídeo (Pi).



**Figura 4:** Extração de sangue em peixe utilizando-se o método da punção caudal (SVOBODOVÁ e VYKUSOVÁ, 1991).

#### **4. Caracterização das alterações morfológicas nucleares por microscopia de luz e obtenção de suas frequências**

As lâminas contendo os esfregaços foram secas ao ar por 24 horas e corados com May-Grünwald diluído 1:20 em tampão fosfato (pH 6,8) por 6 minutos. Uma lâmina por animal foi marcada com código numérico para uma “análise cega”. Os campos foram observados em microscópio de luz Olympus BX41 com lente de imersão (objetiva de 100x), sendo analisados 2000 eritrócitos por lâmina para a obtenção das frequências das alterações nucleares bolha nuclear, broto nuclear, condensação nuclear, fissura nuclear, núcleo lobado, micronúcleo e vacuolização nuclear, seguindo o modelo zig-zag para evitar o cruzamento da mesma área mais de uma vez.

#### **5. Determinação das linhagens eritrocíticas, granulocíticas, linfocíticas e trombocíticas do sangue periférico de tilápias.**

Amostras do sangue periférico (3mL) foram obtidas de *O. niloticus* através de punção caudal utilizando seringa contendo o anticoagulante EDTA. Foram analisados 2 tratamentos para a determinação das linhagens

sanguíneas. Um tratamento utilizando sangue fixado (SF) com formol 4% na proporção de 1:1 e outro tratamento utilizando sangue não fixado (SNF). Parte das alíquotas de cada tratamento foi analisada diretamente, obtendo a caracterização de sangue total fixado e não fixado. A outra parte destas alíquotas foi processada por gradiente de Ficoll (alíquotas fixadas) e por decantação (alíquotas não fixadas), para a obtenção das frações eritrocíticas e leucocíticas fixadas e não fixadas, conforme protocolo abaixo.

A cada alíquota de SF, submetidas ao gradiente de Ficoll, foi acrescentado o mesmo volume de PBS (1:1), obtendo um volume final de 3mL. Foi utilizado 3 mL de Ficoll para cada alíquota (o mesmo volume final de sangue - SF + PBS). O sangue fixado (SF + PBS) foi lentamente adicionado ao Ficoll, na proporção de 1:1 em tubos de poliestireno (Falcon – BD - 10 mL). Os tubos foram centrifugados a 400g durante 40 minutos em uma temperatura de 18 a 22°C. Ao final da centrifugação foi obtido um anel de células brancas (linfócitos + trombócitos) entre a mistura de Ficoll e o plasma. Abaixo do Ficoll, encontrava-se a população granulocítica e eritrocítica. Amostras destas porções celulares foram recolhidas e adquiridas no citômetro de fluxo.

As amostras de SNF foram decantadas por 24 horas sob-refrigeração (4°C). Ao final deste tempo, a porção eritrocítica e o anel de leucócitos depositado sobre a porção de eritrócitos foram retirados cuidadosamente e adquiridas pelo citômetro.

Todas as amostras foram acrescidas de PBS estéril antes de serem adquiridas pelo citômetro de fluxo. As populações celulares formadas através dos procedimentos de separação foram adquiridas no citômetro (FACSCan Becton Dickinson), produzindo gráficos FSC x SSC.

## 6. Avaliação da frequência das populações eritrocíticas, leucocíticas e trombocíticas marcadas com Pi por citometria de fluxo

Alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  do sangue obtidas dos animais em cada um dos períodos de amostragem (48-, 96- e 144 horas) foram mantidas sob refrigeração em tubos de poliestireno de 2 mL por aproximadamente 1 hora. Foram analisados 15 animais (5 por tratamento) a cada tempo de coleta.

Deste volume sanguíneo (250  $\mu\text{L}$ ) foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  divididos em 2 microtubos, 25  $\mu\text{L}$  de sangue não recebeu marcadores (controle negativo) e 25  $\mu\text{L}$  recebeu 3  $\mu\text{L}$  do marcador fluorescente iodeto de propídeo (Pi), a uma concentração de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Após período de 15 minutos de incubação sob o abrigo de luz, as amostras sanguíneas foram acrescidas de PBS. As amostras contendo suspensão de celular foram adquiridas imediatamente no citômetro de fluxo.

Das alíquotas “controles negativos” foram adquiridos frequências populacionais de eritrócitos, granulócitos, linfócitos e trombócitos. E nas alíquotas marcadas com Pi foram avaliadas a percentagem de células mortas.



**Figura 5:** Esquema demonstrativo do processamento das amostras sanguíneas para aquisição em citômetro de fluxo.

## 7. Aquisição e análise dos dados no citômetro de fluxo

O citômetro de fluxo (FACscan, BD-USA) utilizando nesse trabalho é equipado com lâmpada de Argônio que permite a avaliação básica de 5 parâmetros: tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e fluorescência do tipo 1 (FL1, FL2, FL3).

Para a determinação das populações sanguíneas foram avaliadas 100.000 células sanguíneas de *O. niloticus*, utilizando os parâmetros SSC e FSC (granulosidade e tamanho respectivamente), em gráficos de dispersão.

Para a análise das células marcadas por Pi foram adquiridas 30.000 células sanguíneas. A fluorescência emitida pelo Iodeto de Propídeo foi detectada pelo canal de fluorescência (FL3) recolhida em um comprimento de onda de 635nm. A identificação das populações celulares de interesse bem como a determinação do valor percentual de células marcadas com Pi foram feitas através de um sistema computacional e do software Flow jo.

## 8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram testados estatisticamente com auxílio do programa *GraphPad Prism 5*. As alterações nucleares eritrocíticas analisadas por microscopia de luz, e as frequências populacionais linfocíticas / trombocíticas analisadas por citometria de fluxo foram analisadas utilizando o teste não paramétrico Qui-quadrado com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). As frequências populacionais de eritrócitos e granulócitos obtidas por citometria de fluxo foram testadas através dos testes paramétricos ANOVA e Bonferroni utilizando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). As frequências de células Pi positivas adquiridas por citometria de fluxo foram

avaliadas pelo teste não paramétricos Mann-Whitney com intervalo de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ). Os valores de células Pi positivas foram transformadas em percentuais afim de eliminar resultados falso-positivos nas análises por Mann-Whitney.

## RESULTADOS

### 1. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos da água, tais como temperatura, taxa de oxigênio dissolvido, concentração de amônia e pH apresentaram níveis adequados para a sobrevivência e manutenção da espécie, e estão sumarizados na tabela 1.

**Tabela 1** – Valores médios da temperatura (°C), taxa de oxigênio (mg/L), amônia (mg.L<sup>-1</sup>) e pH obtidos dos aquários durante o período experimental.

Temperatura	Oxigênio	Amônia	pH
21,90 ± 0,73	7,76 ± 0,25	0,71x10 <sup>-3</sup>	7,72 ± 0,09

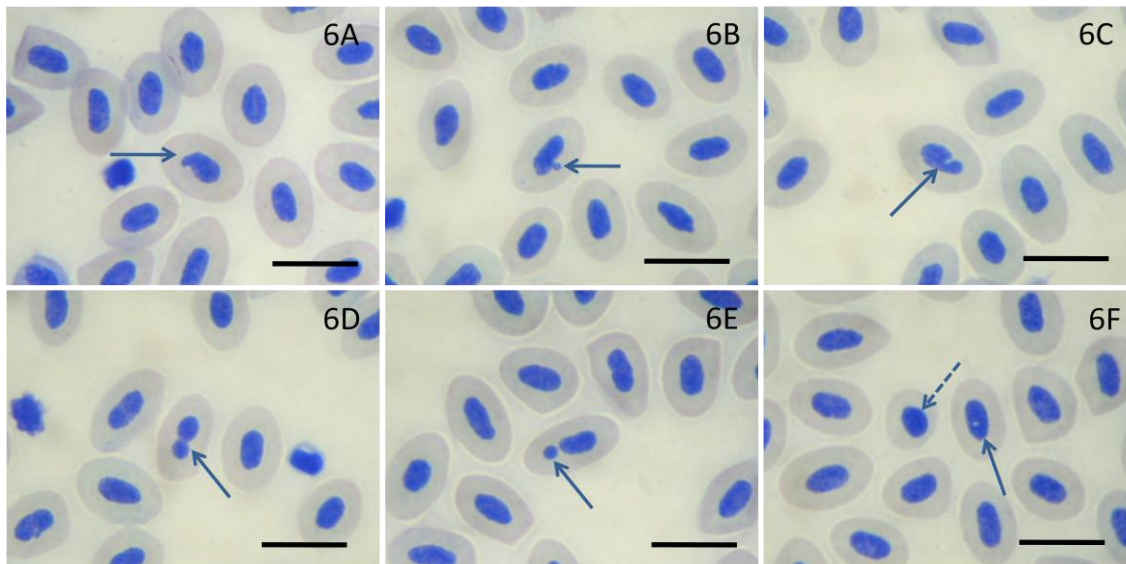
### 2. Animais e biometria

Os animais analisados apresentaram os valores médios ± desvio padrão para o comprimento total e peso corporal de 10,05 cm ± 1,11 e 17,36 g ± 5,57, respectivamente. Todos os animais analisados mantiveram bom aspecto geral, não sendo observada nenhuma alteração em sua porção externa.

### 3. Alterações morfológicas encontradas em eritrócitos de *O. niloticus*

As alterações nucleares eritrocíticas (ANEs) denominadas bolha nuclear (BO), broto nuclear (BR), condensação nuclear (CO), fissura nuclear (FI), núcleo lobado (LO), micronúcleo (MN) e vacuolização nuclear (VA) foram observadas em todos os tratamentos (Fig. 6). As alterações bolha nuclear, núcleo lobado e fissura nuclear vem sendo descritas pela literatura científica

como “blebbed”, “lobed” e “notched” respectivamente. Neste trabalho foi criada uma tradução para estes nomes, visando unificar as nomenclaturas destas alterações em apenas uma língua.



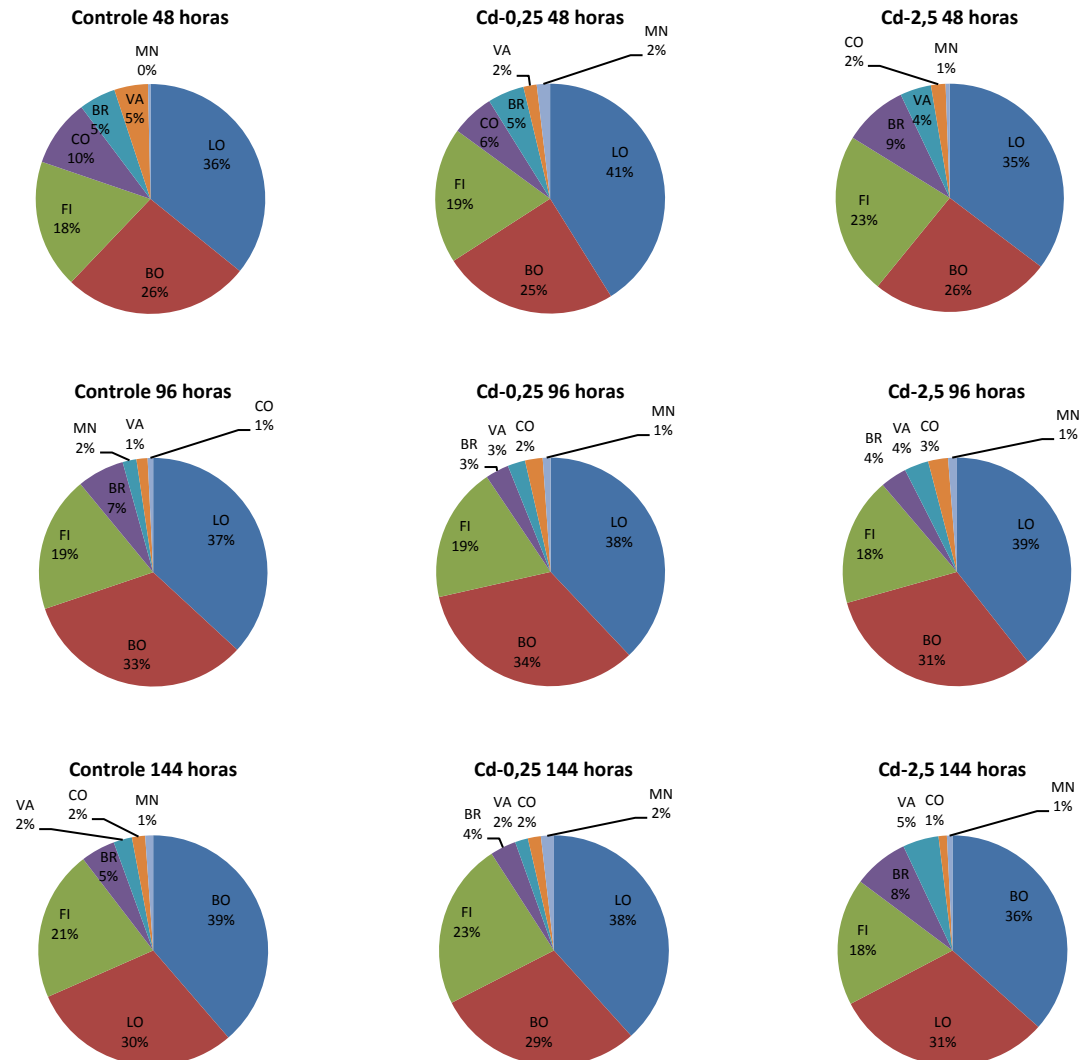
**Figura 6.** Micrografias de luz do tecido sanguíneo de *O. niloticus* mostrando as alterações nucleares eritrocíticas. Em *A*, observar núcleo formando pequena bolha em uma das extremidades (seta), denominado bolha nuclear. Em *B*, broto nuclear (seta). Notar em *C* uma fissura nuclear (seta). Observar em *D*, núcleo com retrações laterais conhecido como núcleo lobado (seta). Fragmento nuclear completamente destacado do núcleo principal em *E*, denominado micronúcleo e em *F*, núcleo com vacúolo nuclear conhecido por vacuolização nuclear (seta) e célula apresentando condensação nuclear (seta tracejada). (Barra = 10  $\mu$ m, Coloração May-Grunwald).

#### **4. Frequências das alterações nucleares eritrocíticas (ANEs) nos diferentes tratamentos por microscopia de luz**

As alterações nucleares em eritrócitos (ANEs) obtidas para cada tratamento (Ct, Cd-0,25 e Cd-2,5) após os períodos de 48, 96 e 144 horas de ensaio estão apresentadas como dados percentuais e sumarizadas na figura 7.

LO, BO e FI foram as ANEs mais frequentes em todos os tempos e tratamentos. A alteração LO foi a alteração de maior ocorrência, com exceção

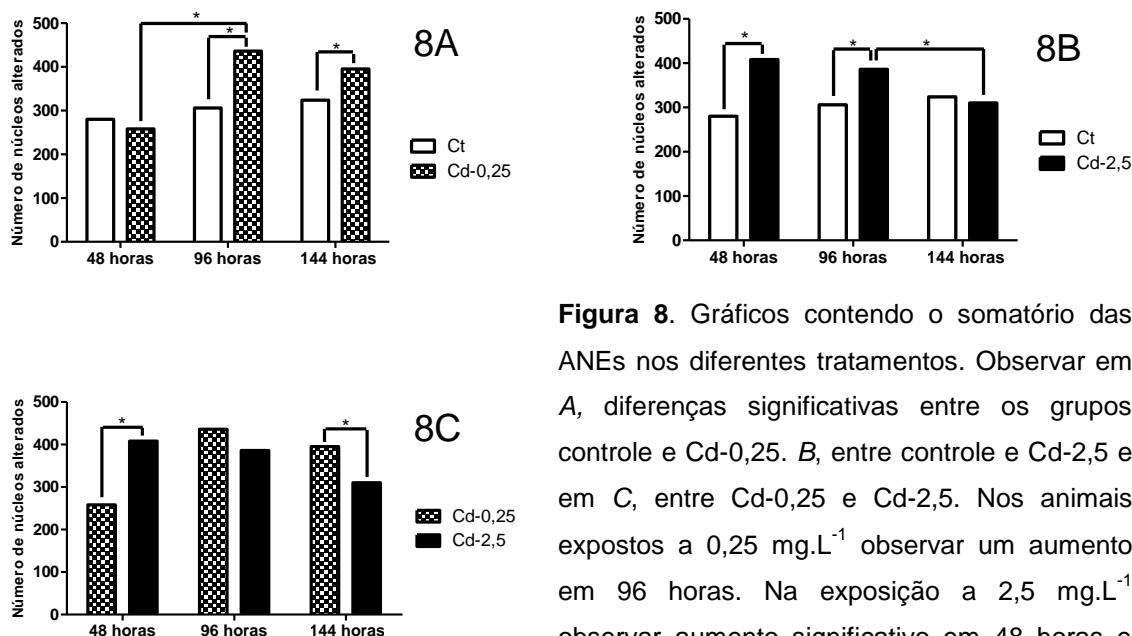
dos tratamentos Ct e Cd-2,5 no tempo de 144 horas, em que esta alteração apresenta uma menor frequência que BO. O MN foi a alteração de menor frequência na maioria dos tratamentos.



**Figura 7:** Ocorrência percentual cada tipo de alteração nuclear eritrocítica (BO – bolha nuclear; BR – broto nuclear; CO – condensação nuclear, FI – fissura nuclear; LO – núcleo lobado; MN – micronúcleo e VA – vacuolização) nos diferentes tratamentos ao longo do tempo. Observar em todos os gráficos as alterações mais frequentes: LO, BO e FI.

## 5. Comparação dos totais das alterações nucleares em eritrócitos (ANEs) nos diferentes tratamentos

Não foram observadas diferenças significativas entre os números totais de ANEs dos tratamentos Ct nos períodos de 48, 96 e 144 horas (Fig. 8). Os animais do grupo Cd-0,25 apresentaram aumento significativo de 43% em relação ao controle após 96 horas de exposição (Fig. 8A). Nos animais pertencentes ao grupo Cd-2,5, um aumento semelhante (45%) foi observado em relação ao controle, após 48 horas de exposição, não sendo verificado aumento entre os tempos de 48 e 96 horas (Fig. 8B). Durante o período de depuração (entre os tempos de 96h e 144 h), apenas no grupo Cd-2,5 foi observado diminuição significativa de 19,6% no total das alterações (Fig 8B). Esta depuração não foi significativa no grupo Cd-0,25 (Fig. 8A), embora tenha sido observado um percentual de diminuição de 10%. Entre os tratamentos Cd-0,25 e Cd-2,5 foi observado um aumento das alterações em 48 horas e diminuição em 144 horas (Fig. 8C).



**Figura 8.** Gráficos contendo o somatório das ANEs nos diferentes tratamentos. Observar em A, diferenças significativas entre os grupos controle e Cd-0,25. B, entre controle e Cd-2,5 e em C, entre Cd-0,25 e Cd-2,5. Nos animais expostos a 0,25 mg.L<sup>-1</sup> observar um aumento em 96 horas. Na exposição a 2,5 mg.L<sup>-1</sup> observar aumento significativo em 48 horas e uma diminuição significativa em 144 horas. Teste Qui-quadrado (p<0,05).

## **6. Influência de cada tipo de alteração sobre os resultados significantes das frequências totais das ANEs**

Alguns resultados obtidos nas análises das frequências totais de ANEs foram influenciados por alterações nucleares específicas. Entretanto, o aumento significativo entre controle e Cd-0,25 observado após 96 horas de exposição não apresentou relação com nenhuma alteração nuclear específica (Tab. 2 e Fig. 8A). Já entre os tempos de 48 e 96 horas de Cd-0,25 o aumento significativo foi devido ao aumento da frequência da alteração bolha nuclear (BO) e fissura nuclear (FI) (Tab. 3 e Fig. 8A).

Entre os tratamentos Ct e Cd-2,5 o aumento não foi influenciado por nenhuma alteração nos tempos de 48 e 96 horas (Tab. 2 e Fig. 8B) apesar do aumento significativo da vacuolização nuclear entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5, no tempo de 48 horas (Tab. 2 e Fig. 8C).

O aumento significativo visualizado entre o grupo Ct e Cd-0,25 em 144 horas, foi evidenciado através do aumento significativo dos núcleos lobados (Tab. 2 e Fig 8A) e também foi verificado que as alterações núcleo lobado e bolha nuclear tiveram seus números reduzidos significativamente em Cd-2,5 em comparação Cd-0,25, no tempo de 144 horas (Tab. 2 e Fig. 8C).

**Tabela 2:** Valores de  $p$  relativos, obtidos pelo teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ) da comparação entre os tratamentos Ct (controle), 0,25 e 2,5 (concentrações de  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  em  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de cada tipo de alteração nuclear eritrocítica (BO – bolha nuclear; BR – broto nuclear; LO – núcleo lobado; MN – micronúcleo; FI – fissura nuclear; VA – vacuolização e CO – condensação nuclear) a cada tempo de experimento.

Tempo (horas)	Tratamentos	Alterações Nucleares em Eritrócitos (ANEs)						
		BO	BR	CO	FI	LO	MN	VA
48	Ct/Cd-0,25	0,8123	0,8681	0,2415	0,0032*	0,2334	0,1824	0,0913
	Ct/Cd-2,5	0,9918	0,6976	0,0001*	0,1529	0,9744	0,7947	0,0639
	Cd-0,25/Cd-2,5	0,8595	0,8529	0,0081*	0,0642	0,1552	0,1631	0,0004*
96	Ct/Cd-0,25	0,9542	0,0747	0,1039	0,9336	0,8597	0,5521	0,5728
	Ct/Cd-2,5	0,6487	0,1599	0,0670	0,7747	0,5621	0,6972	0,2369
	Cd-0,25/Cd-2,5	0,5100	0,8778	0,9416	0,8089	0,7045	0,8463	0,6097
144	Ct/Cd-0,25	0,0094*	0,4577	0,9219	0,5299	0,0162*	0,7930	0,6831
	Ct/Cd-2,5	0,6375	0,1977	0,8038	0,3041	0,8477	0,7479	0,1170
	Cd-0,25/Cd-2,5	0,0470*	0,0225*	0,8496	0,0743	0,0371*	0,5754	0,0200*

A diminuição significativa das alterações que representa a depuração da frequência das ANEs totais (96 a 144 horas) foi observada apenas no grupo Cd-2,5 e a alteração que contribuiu significativamente para esta diminuição foi o núcleo lobado (Tab. 3 e Fig. 8B).

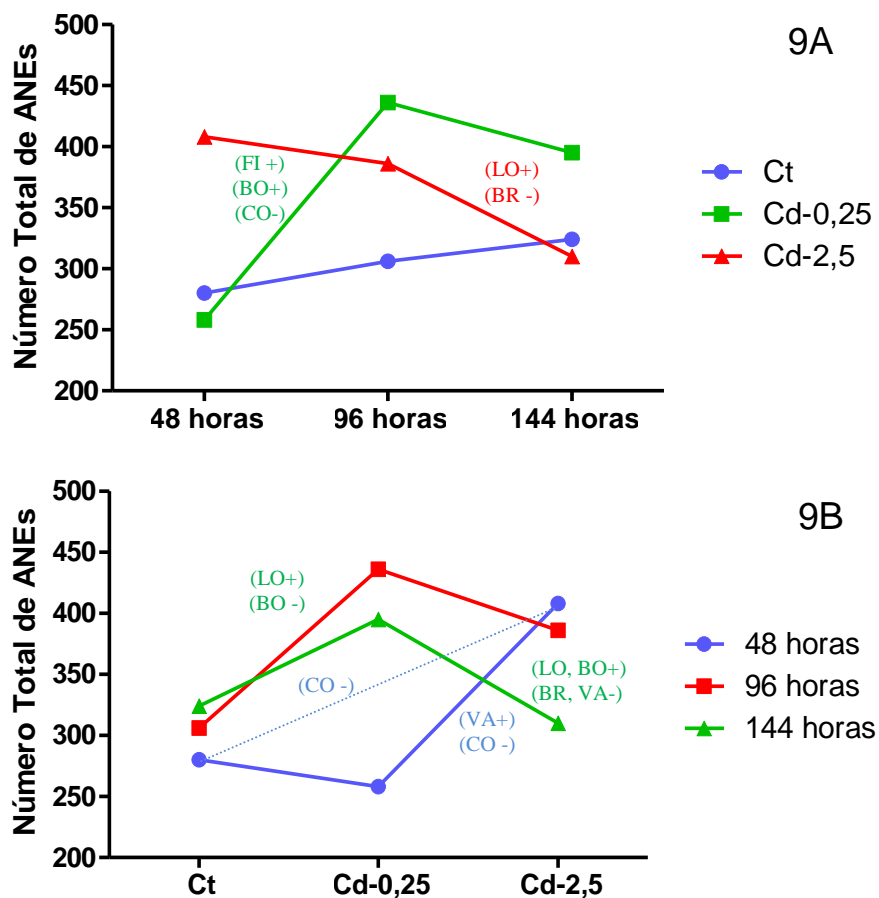
Outros dados significativos obtidos nas tabelas 3 e 4 apresentaram respostas contrárias às obtidas pela avaliação total das ANEs. Este comportamento foi observado pela alteração condensação nuclear (CO) no grupo Cd-0,25 entre os tempos de 48 e 96 horas (Tab. 3). CO também foi visualizada contribuindo negativamente na diferença significativa entre o grupo Ct e o grupo Cd-2,5 de 48 horas e também na diferença entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5 de 48 horas (Tab. 2). A alteração broto nuclear (BR) aparece atuando negativamente no tempo de 144 horas entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5, juntamente com a vacuolização (VA) (Tab. 3). O broto nuclear ainda apresenta resposta contrária à obtida após o período de depuração observado

entre os tempos de 96 e 144 horas do grupo Cd-2,5 (Tab. 2). A bolha nuclear (BO) ocorre negativamente no tempo de 144 horas entre os grupos Ct e Cd-0,25 (Tab. 3).

Esses dados estão sumarizados nas figuras 9A e 9B que contém graficamente as alterações relacionadas positivamente e negativamente com o número total de ANEs observadas a cada tratamento.

**Tabela 3:** Valores de  $p$  relativos, obtidos pelo teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os diferentes períodos para cada tipo de alteração nuclear eritrocítica (BO – bolha nuclear; BR – broto nuclear; LO – núcleo lobado; MN – micronúcleo; FI – fissura nuclear; VA – vacuolização e CO – condensação nuclear) nos diferentes tratamentos Ct (controle) e 0,25 e 2,5 (concentrações de  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  em  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Tratamentos	Tempo (horas)	Alterações Nucleares em Eritrócitos (ANEs)						
		BO	BR	CO	FI	LO	MN	VA
Ct	48/96	0,0810	0,6694	0,0001*	0,8224	0,8265	0,1602	0,0390*
	96/144	0,1692	0,4891	0,3239	0,5966	0,0629	0,6818	0,6480
Cd-0,25	48/96	0,0203*	0,4039	0,0265*	0,0028*	0,4441	0,6061	0,8146
	96/144	0,2001	0,9350	0,5994	0,1328	0,9066	0,6557	0,5994
Cd-2,5	48/96	0,1109	0,8469	0,5573	0,1055	0,2644	0,4047	0,0016*
	96/144	0,1587	0,0421*	0,2520	0,9722	0,0207*	0,9639	0,3242

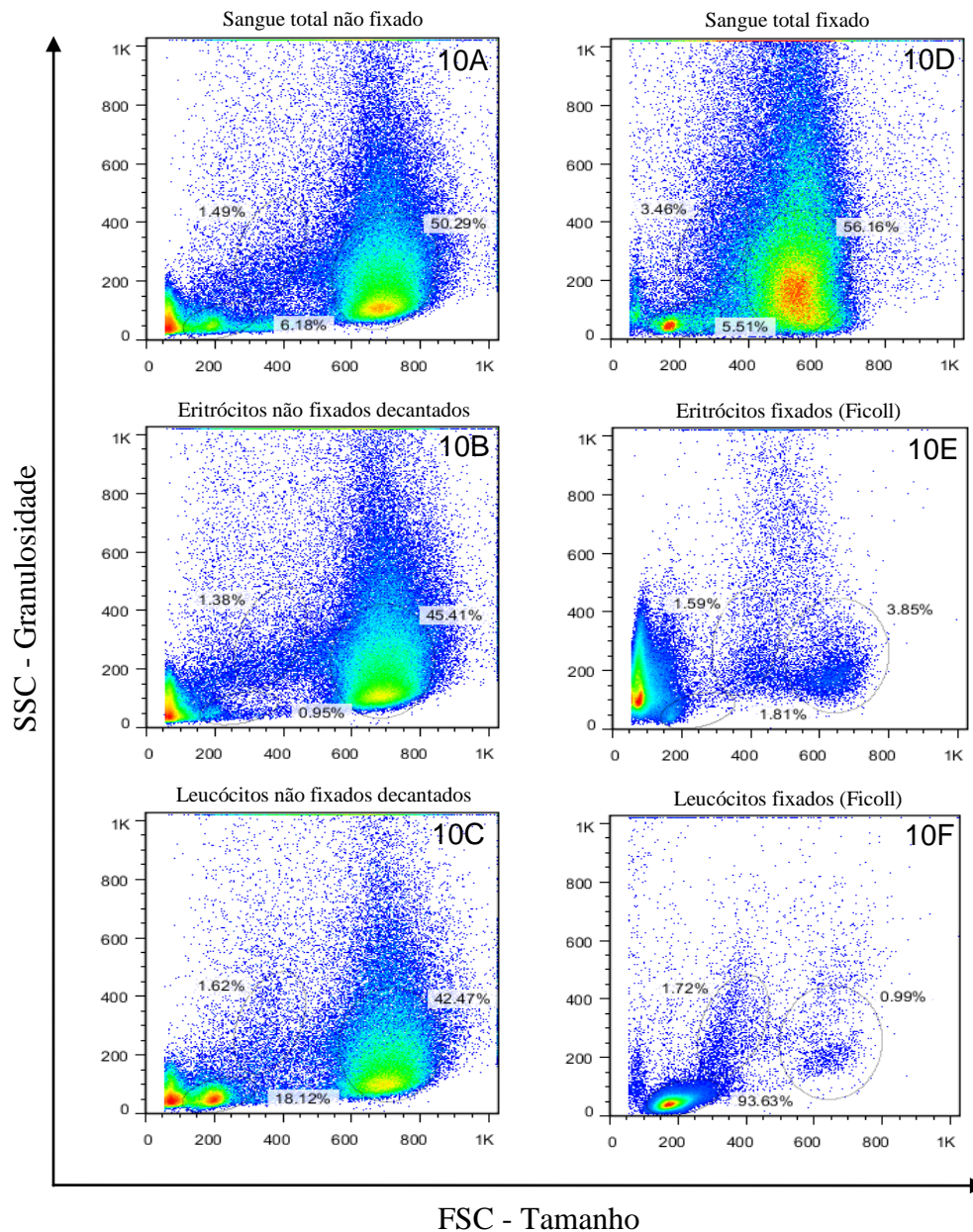


**Figura 9.** Gráficos contendo o número total de ANEs dos diferentes tratamentos. Em *A*, observar alterações nucleares significativas nos tratamentos entre os períodos de experimentação. Em *B*, alterações significativas nos períodos de experimentação entre os tratamentos. BO – bolha nuclear; CO – condensação nuclear; FI – fissura nuclear; LO – núcleo lobado e VA – vacuolização nuclear. Teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

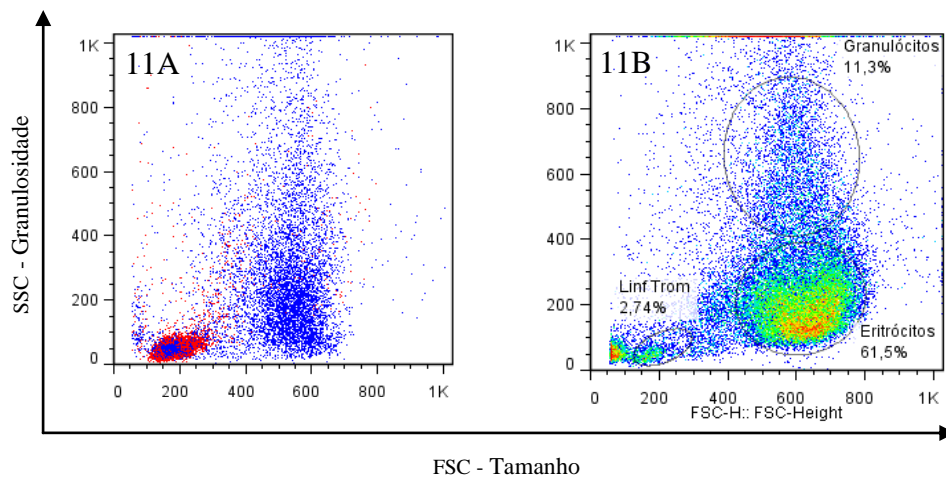
## 7. Determinação das populações: eritrócítica, granulocítica, linfocítica e trombocítica de tilápias através de citometria de fluxo

Foram analisadas amostras não fixadas (SNF) e fixadas (SF) separadas respectivamente por decantação e gradiente de Ficoll. As amostras SNF (Fig. 10A) e SF (Fig. 10D) apresentaram perfil semelhante na distribuição de suas populações. Os gráficos obtidos por citometria de fluxo evidenciaram uma retração do tamanho celular nas populações sanguíneas da amostra fixada

(SF). Ao coletar células da porção vermelha decantada, foi possível observar uma diminuição da porção linfocítica/trombocítica do sangue total (6,18%) (Fig. 10A) para 0,95% da porção eritrocítica decantada (Fig. 10B). Também foi possível observar uma elevação da população linfocítica/trombocítica para 18,12% na amostra retirada da porção rica em leucócitos depositados sobre a porção vermelha do sangue decantado (Fig 10C). A segregação das amostras fixadas por gradiente de Ficoll determinou a população de linfócitos e trombócitos (Fig. 10F), a qual foi confirmada pelas análises nas amostras SNF decantado e pela sobreposição dos gráficos de linfócitos e trombócitos separados por Ficoll e de sangue total fixado (Fig. 11A). Com a identificação da população linfocítica e trombocítica, a população mais numerosa foi identificada como porção rica em eritrócitos e granulócitos. Essas células foram facilmente distinguíveis através da granulosidade. A amostra SNF não passou pelo processo de segregação pelo Ficoll, uma vez que este gradiente afetou o perfil de distribuição normal das células sanguíneas nos gráficos de citometria de fluxo (dados não mostrados). As amostras fixadas segregadas pelo Ficoll também tiveram o perfil de eritrócitos e granulócitos comprometidos (Fig 10E).



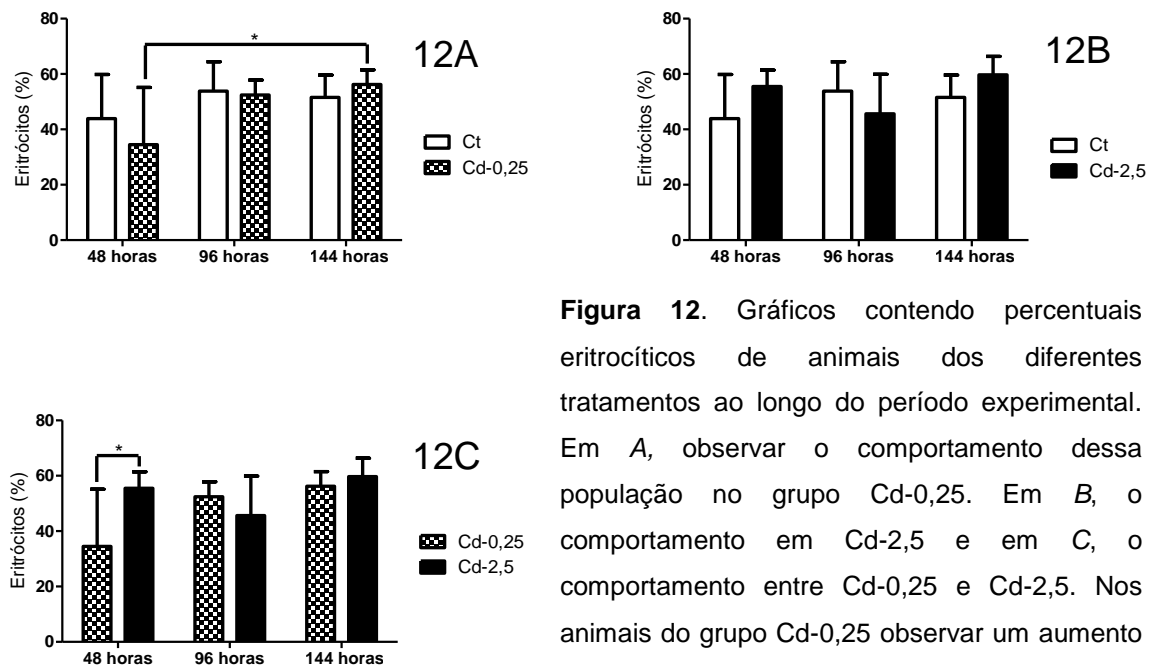
**Figura 10.** Determinação das populações celulares presentes no sangue periférico de *O. niloticus* por citometria de fluxo. As figuras de A a F representam o perfil celular obtido a partir de gráficos de distribuição por densidades de pontos de SSC (granulosidade) X FSC (tamanho) coloridos artificialmente pelo software Flow jo. Observar em A, distribuição das populações de sangue total não fixado. Em B, populações sanguíneas da porção rica em eritrócitos de sangue total não fixado decantado. Notar em C, as populações da porção rica em leucócitos de sangue total não fixado decantado. Observar a distribuição das células sanguíneas fixadas em D. Em E, análise de porção rica em eritrócitos de sangue total fixado e separado por gradiente de Ficoll. Em F, porção rica em linfócitos e trombócitos de sangue total fixado separado por gradiente de Ficoll.



**Figura 11.** Gráfico demonstrativo das populações de células sanguíneas de *O. niloticus* utilizando os parâmetros SSC (granulosidade) X FSC (tamanho). Em A, observar a sobreposição dos plots das figuras 10D e 10F, demonstrando população de linfócitos e trombócitos em vermelho e sangue total em azul. Em B, o demonstrativo das populações de *O. niloticus*

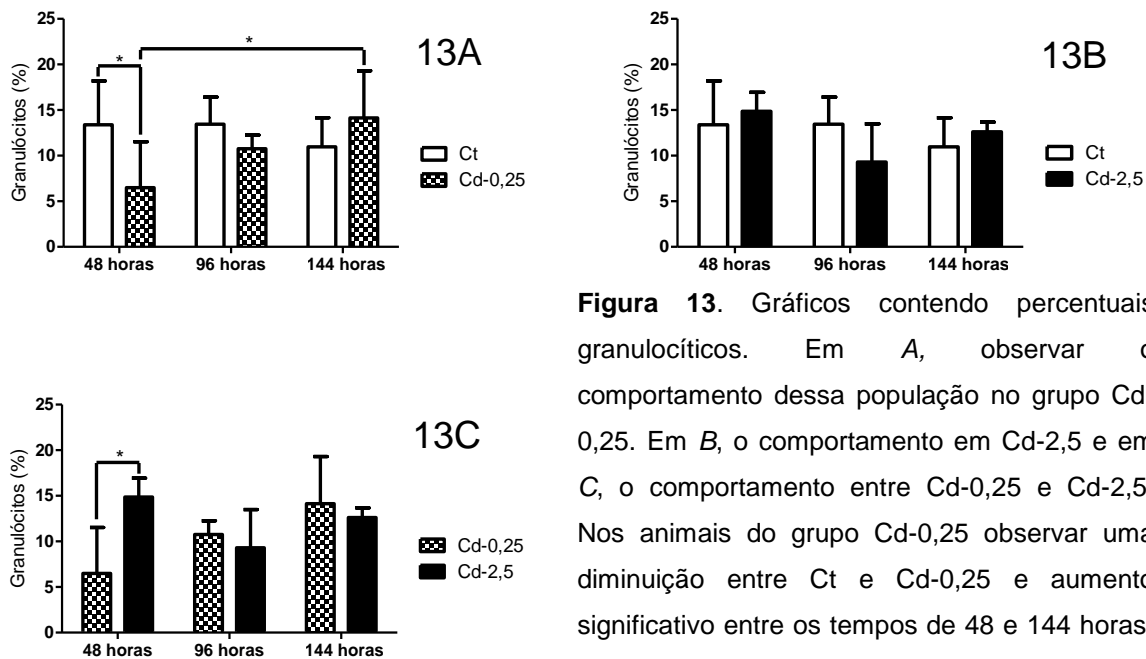
## 8. Avaliações das frequências populacionais sanguíneas utilizando citometria de fluxo

Nas análises por citometria de fluxo foi possível verificar alterações significativas no percentual de eritrócitos, granulócitos e linfócitos/trombócitos nos diferentes tratamentos ao longo do tempo. Não foi observada nenhuma alteração significativa no percentual de eritrócitos entre os grupos Ct e Cd-2,5. (Fig. 12B). No tempo de 48 horas, os animais apresentaram maior percentagem no tratamento Cd-2,5 em comparação com Cd-0,25 (Fig. 12C). No grupo Cd-0,25, foi observado um maior percentagem no tempo de 144 horas em relação a 48 horas (Fig. 12A).



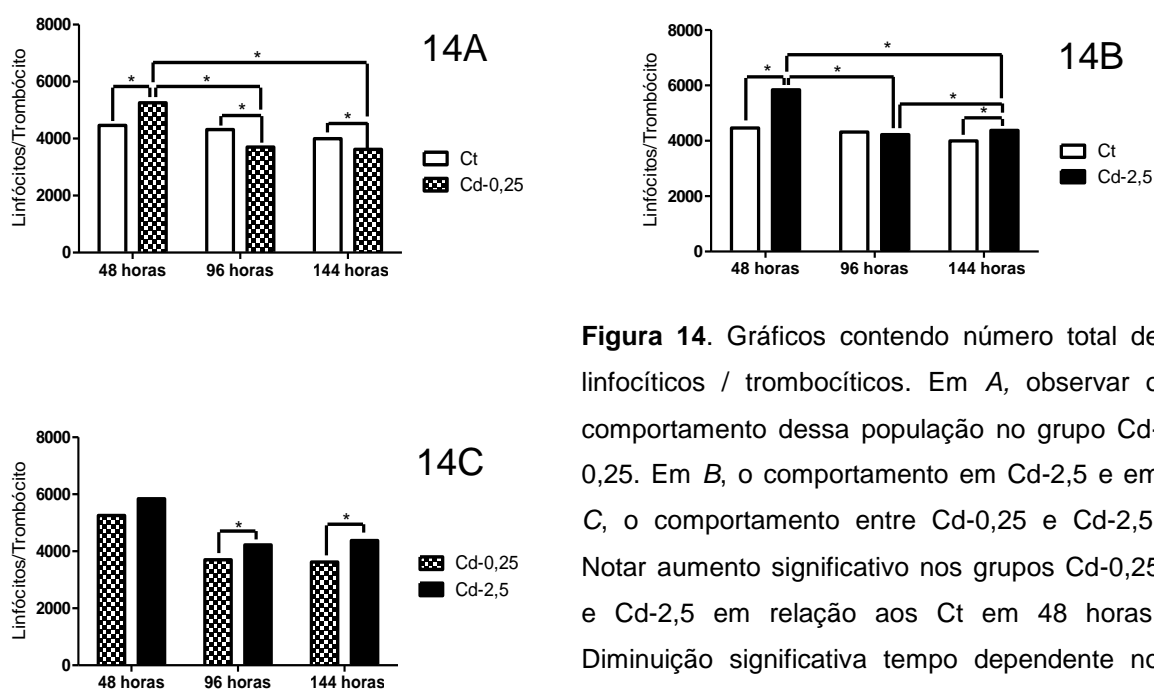
**Figura 12.** Gráficos contendo percentuais eritrócíticos de animais dos diferentes tratamentos ao longo do período experimental. Em *A*, observar o comportamento dessa população no grupo Cd-0,25. Em *B*, o comportamento em Cd-2,5 e em *C*, o comportamento entre Cd-0,25 e Cd-2,5. Nos animais do grupo Cd-0,25 observar um aumento entre 48 e 96 horas. Entre Cd-0,25 e Cd-2,5 observar aumento significativo em 48 horas. Teste ANOVA e Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Os animais apresentaram alterações nas taxas de granulócitos semelhantes às alterações encontradas nos eritrócitos. Os granulócitos apresentaram no tempo de 48 horas menor percentagem no grupo Cd-0,25 comparado ao grupo Ct e assim como nos eritrócitos, foi observado aumento significativo no tratamento Cd-0,25 entre os tempos de 48 e 144 horas (Fig. 13A). Não foram observadas alterações na taxa de granulócitos entre os tratamentos Ct e Cd-2,5 (Fig. 13B) e também foi observado aumento significativo em Cd-2,5 em comparação Cd-0,25 no tempo de 48 horas (Fig. 13C).



**Figura 13.** Gráficos contendo percentuais granulocíticos. Em A, observar o comportamento dessa população no grupo Cd-0,25. Em B, o comportamento em Cd-2,5 e em C, o comportamento entre Cd-0,25 e Cd-2,5. Nos animais do grupo Cd-0,25 observar uma diminuição entre Ct e Cd-0,25 e aumento significativo entre os tempos de 48 e 144 horas. Entre Cd-0,25 e Cd-2,5 observar aumento significativo em 48 horas. Teste ANOVA e Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Na população linfocítica/trombocítica foi possível observar um maior número total em 48 horas nos grupos Cd-0,25 e Cd-2,5 em comparação ao grupo Ct (Fig. 14A e 14B). Nos grupos Cd-0,25 houve diminuição nas taxas de linfócitos/trombócitos ao longo do tempo de exposição (Fig. 14A). Entretanto, no grupo Cd-2,5, esta diminuição foi observada entre os tempos 48 e 96 horas e um aumento foi verificado quando os animais foram retirados do contaminante (entre 96 e 144 horas) (Fig. 14B). O grupo Cd-2,5 apresentou maiores frequências de linfócitos/trombócitos em comparação ao grupo Cd-0,25 nos tempos de 96 horas e 144 horas (Fig. 14C).



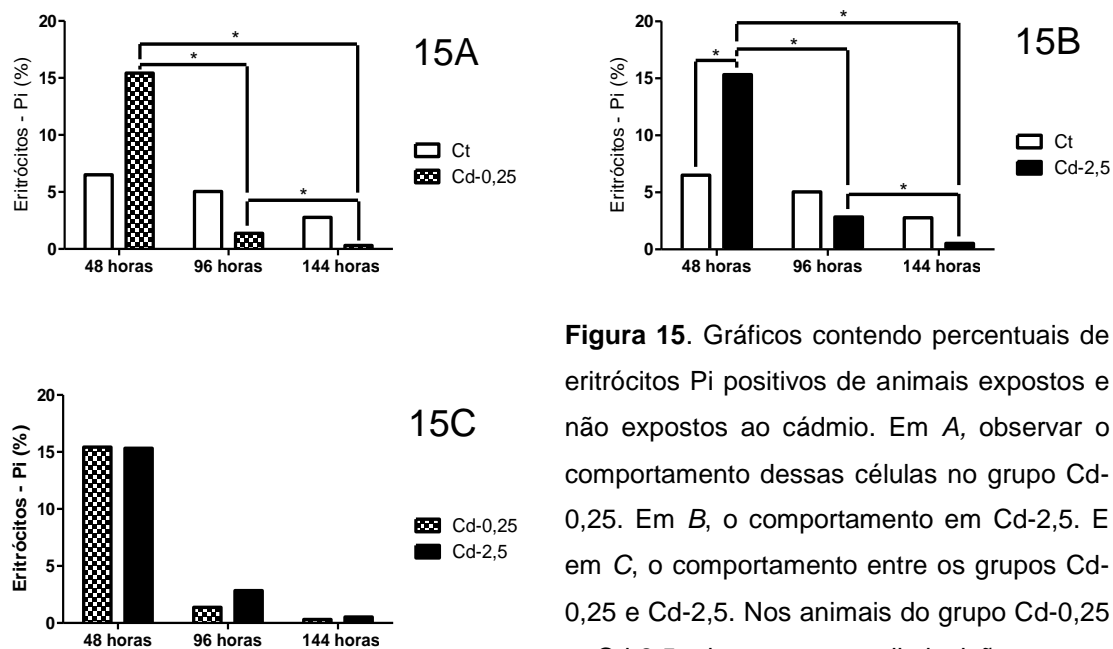
**Figura 14.** Gráficos contendo número total de linfocíticos / trombocíticos. Em *A*, observar o comportamento dessa população no grupo Cd-0,25. Em *B*, o comportamento em Cd-2,5 e em *C*, o comportamento entre Cd-0,25 e Cd-2,5. Notar aumento significativo nos grupos Cd-0,25 e Cd-2,5 em relação aos Ct em 48 horas. Diminuição significativa tempo dependente no grupo Cd-0,25 e Cd-2,5 entre 48 e 96 horas. Observar aumento entre os tempos de 96 e 144 horas no grupo Cd-2,5. Teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

## 9. Análise das alterações morfológicas causadas por cádmio nas populações sanguíneas utilizando Iodeto de Propídeo (Pi)

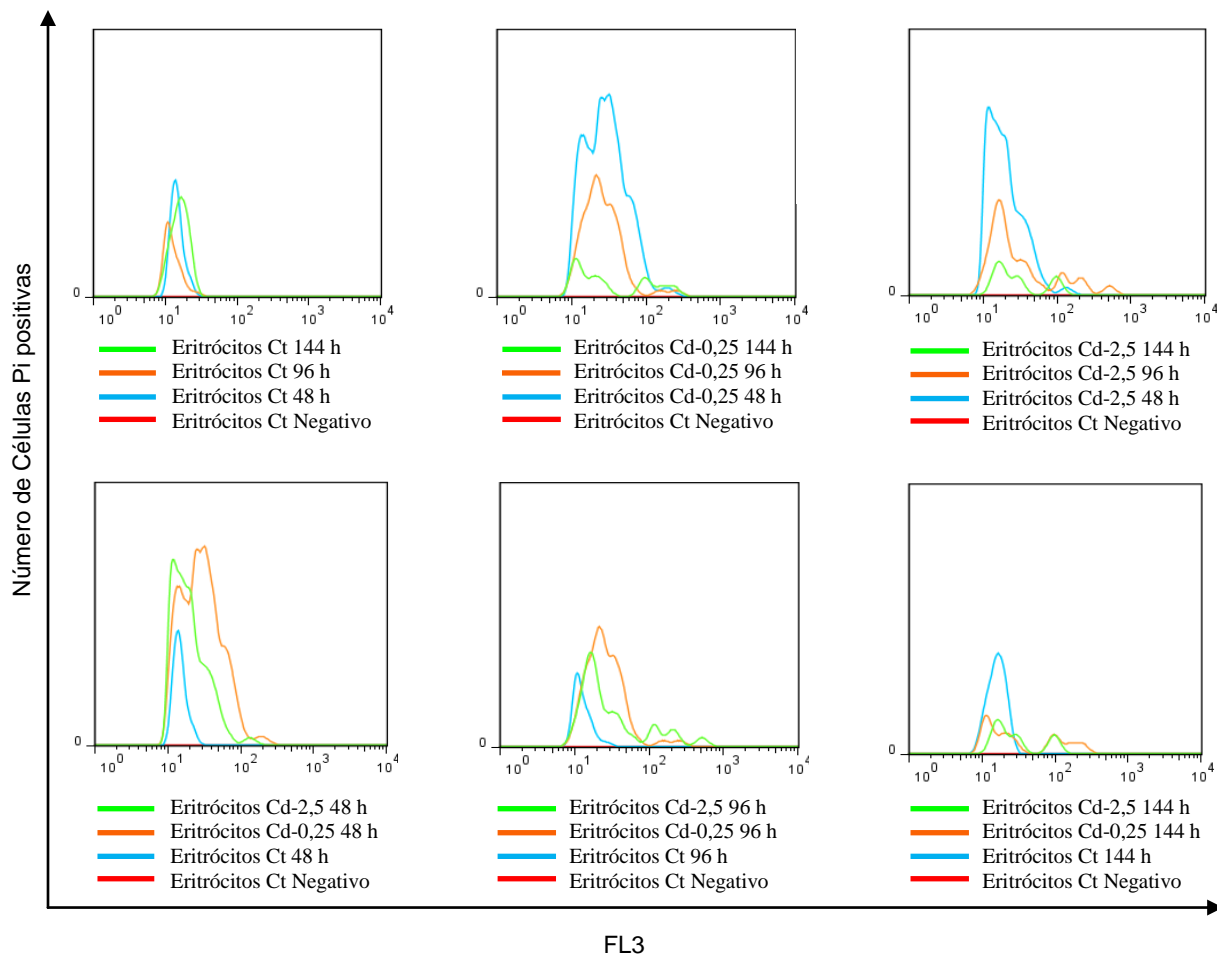
A avaliação da integridade de membrana plasmática foi realizada nos diferentes tipos de células sanguíneas estudadas. Os eritrócitos, granulócitos e linfócitos/trombócitos apresentaram aumento nas primeiras 48 horas de exposição de forma significativa apenas no grupo Cd-2,5, e a partir daí houve um decréscimo nas taxas de células Pi positivas tempo-dependente (Fig. 15A).

Nos eritrócitos, este aumento foi significativo e a diminuição foi observada a cada tempo de exposição nos dois grupos de exposição, Cd-0,25 e Cd-2,5 (Fig.15A e 15B). Sendo observado aumento na fluorescência tempo e

dose dependente (Fig. 16). Não houve diferença significativa entre os grupos Ct e entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5 em nenhum tempo estudado (Fig.15C).

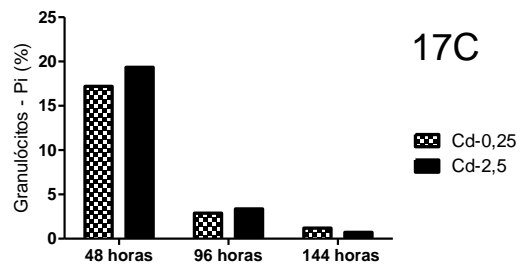
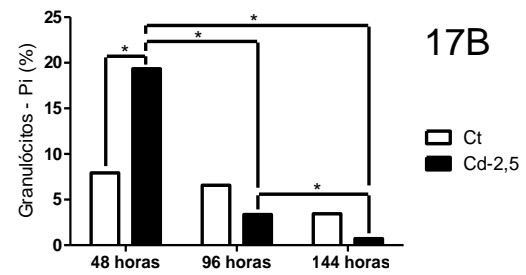
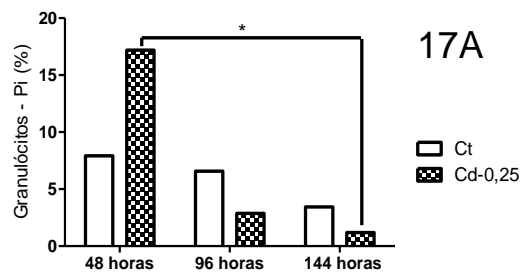


**Figura 15.** Gráficos contendo percentuais de eritrócitos Pi positivos de animais expostos e não expostos ao cádmio. Em *A*, observar o comportamento dessas células no grupo Cd-0,25. Em *B*, o comportamento em Cd-2,5. E em *C*, o comportamento entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5. Nos animais do grupo Cd-0,25 e Cd-2,5 observar uma diminuição tempo-dependente e entre os grupos Ct e Cd-2,5 observar aumento significativo em 48 horas. Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

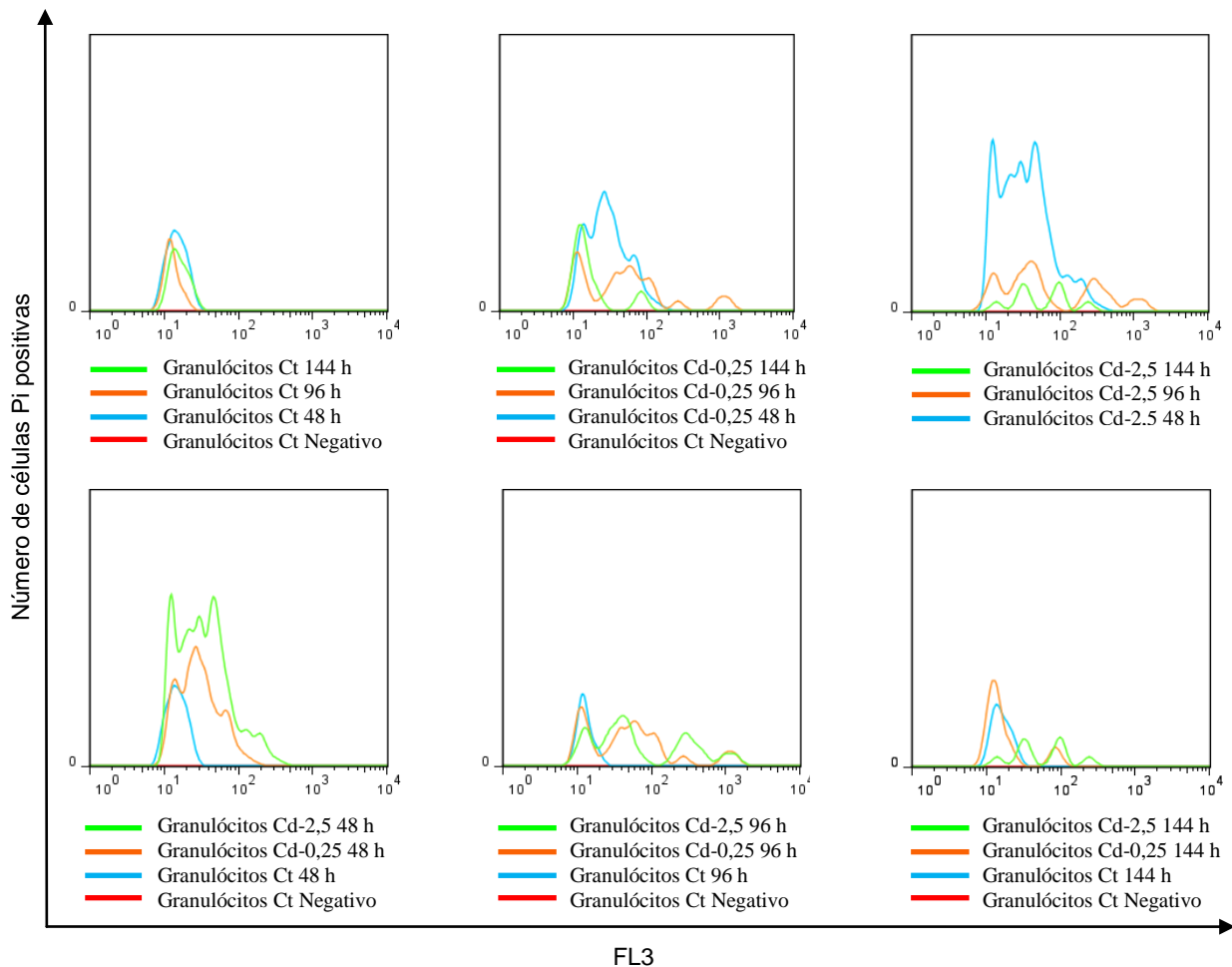


**Figura 16.** Histogramas de citometria de fluxo mostrando eritrócitos de *O. niloticus* em diferentes tratamentos marcados por Pi (iodeto de propídeo) no canal de fluorescência FL3.

As análises em granulócitos Pi positivos de animais não expostos e expostos ao cádmio apresentaram respostas semelhantes às análises em eritrócitos. Em granulócitos também não foi observada diferença significativa entre os grupos Ct controles e entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5 (Fig. 17C). No grupo Cd-2,5 foi observado aumento significativo em relação ao controle em 48 horas (Fig. 17B). Uma diminuição significativa foi observada nos dois grupos de exposição Cd-0,25 e Cd-2,5 entre os tempos 48 e 144 horas (Fig. 17A e 17B). Ainda no grupo Cd-2,5 esta diminuição foi significativa entre os tempos 48 e 96 horas e entre 96 e 144 horas (Fig. 17B). Também nos granulócitos foi observado aumento da fluorescência tempo e dose dependente (Fig. 18).

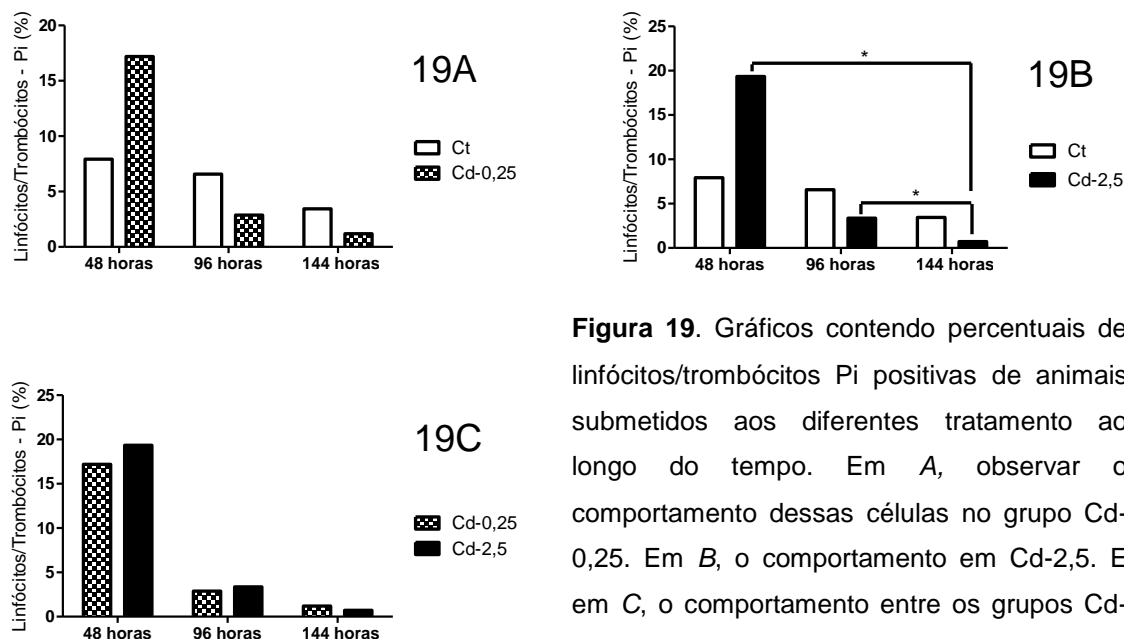


**Figura 17.** Gráficos contendo percentuais de granulócitos Pi positivas de animais submetidos aos diferentes tratamentos ao longo do tempo. Em *A*, observar o comportamento dessas células no grupo Cd-0,25. Em *B*, o comportamento em Cd-2,5. E em *C*, o comportamento entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5. Nos animais do grupo Cd-0,25 e Cd-2,5 observar uma diminuição tempo-dependente. E aumento entre os grupos Ct e Cd-2,5 no tempo 48 horas. Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

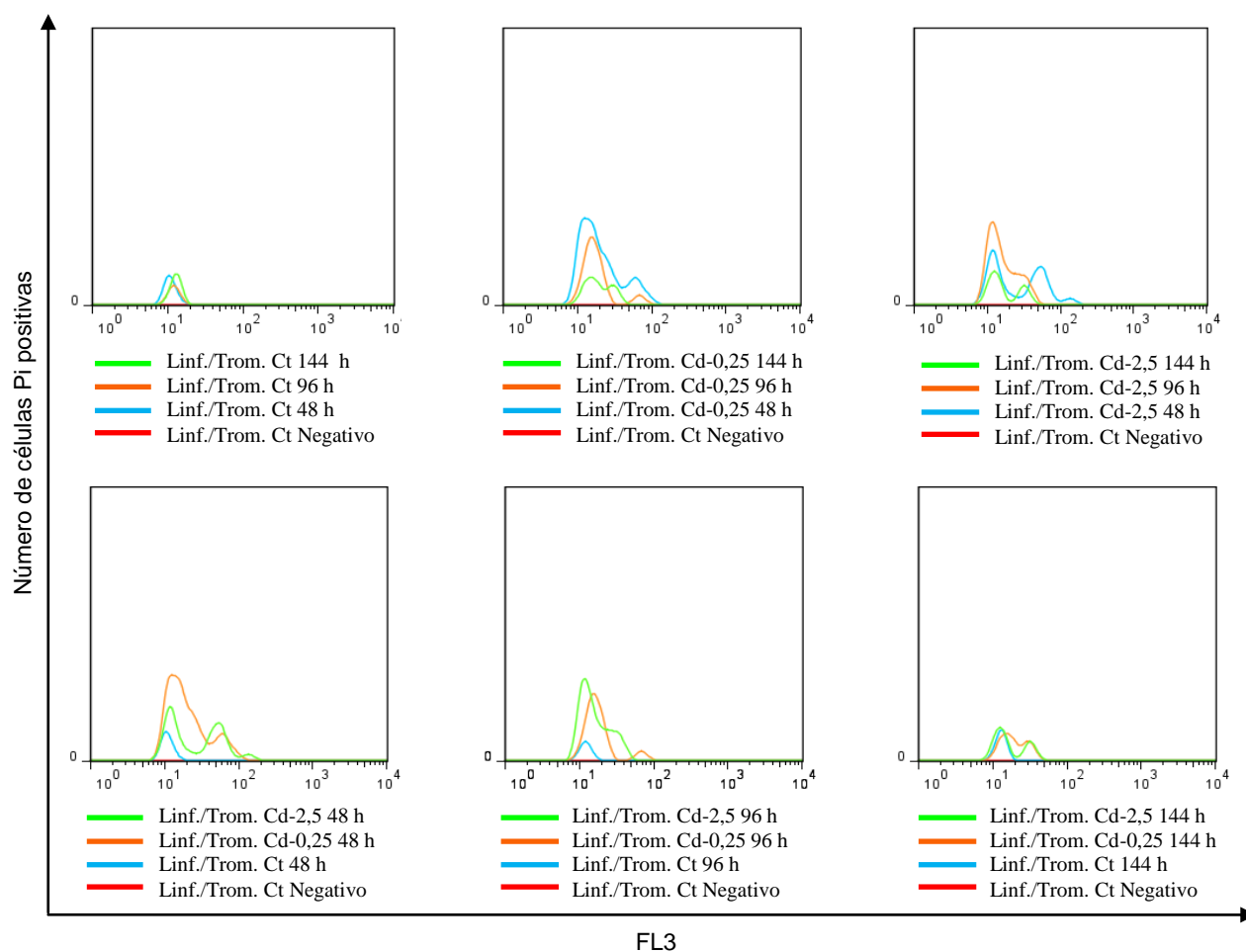


**Figura 18.** Histogramas de citometria de fluxo mostrando granulócitos de *O. niloticus* nos diferentes tratamentos marcados por Pi (iodeto de propídeo) no canal de fluorescência FL3.

Na porção constituída por linfócitos e trombócitos, nenhuma significância foi observada entre os grupos Ct e entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5 (Fig. 19A e 19C), embora tenha sido observada diminuição nas taxas de células Pi positivas no grupo Cd-0,25. Apenas no grupo Cd-2,5 foi verificada diminuição significativa entre os tempos de exposição (Fig. 19B). O decréscimo significativo nas taxas de células Pi positivas foi mais intenso entre os tempos de 96 e 144 horas, o que também foi verificado entre os tempos de 48 e 144 horas. Aumento na fluorescência foi observado ao longo do tempo e em todos os tratamentos (Fig. 20).



**Figura 19.** Gráficos contendo percentuais de linfócitos/trombócitos Pi positivas de animais submetidos aos diferentes tratamento ao longo do tempo. Em A, observar o comportamento dessas células no grupo Cd-0,25. Em B, o comportamento em Cd-2,5. E em C, o comportamento entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5. Nos animais do grupo Cd-2,5 observar uma diminuição tempo-dependente. Teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20.** Histogramas de citometria de fluxo mostrando linfócitos/trombócitos de *O. niloticus* nos diferentes tratamentos marcados por Pi (iodeto de propídeo) no canal de fluorescência FL3.

## 10. Correlações entre alterações nucleares eritrocíticas (ANEs) e eritrócitos Pi positivos

Através do teste não paramétrico de Sperman, foi possível observar uma alta correlação positiva entre as células marcadas por Pi e a alteração nuclear eritrocítica, núcleo lobado (LO) (Tab. 4). Esta alteração aparece influenciando a diminuição significativa entre 96- e 144 horas (período de depuração), no grupo Cd-2,5. Estes resultados apontam para o desaparecimento de alguns eritrócitos que contém o núcleo lobado. Este dado é corroborado pela correlação desta ANE com os dados de eritrócitos Pi positivos que também apresenta diminuição significativa no período de depuração da mais alta concentração.

**Tabela 4** – Valores correlativos entre as ANEs e eritrócitos Pi positivos no tempo de 144 horas e concentração de cádmio de 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, obtidos pelo método de Sperman ( $p < 0,05$ ). BO – bolha nuclear; BR – broto nuclear; CO – condensação nuclear; FI – fissura nuclear; LO – núcleo lobado; MN – micronúcleo; VA – vacuolização nuclear e Pi – células positivas para Pi (iodeto de propídeo).

2,5 mg.L <sup>-1</sup> 144 horas (Período de Depuração)								
	BO	BR	CO	FI	LO	MN	VA	Pi
BO		0,896*	-0,051	0,696	0,928*	-0,034	0,062	0,872
BR	0,896*		-0,139	0,912*	0,971*	0,226	0,375	0,975*
CO	-0,051	-0,139		-0,101	-0,169	-0,480	-0,287	-0,707
FI	0,696	0,912*	-0,101		0,829	0,541	0,334	0,800
LO	0,928*	0,971*	-0,169	0,829		0,135	0,395	1,000*
MN	-0,034	0,226	-0,480	0,541	0,135		0,072	0,447
VA	0,062	0,375	-0,287	0,334	0,395	0,072		0,447
Pi	0,872	0,975*	-0,707	0,800	1,000*	0,447	0,447	

Valores marcados por \* são referidos como correlatos. (Teste Sperman,  $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

### 1. Condições experimentais

A tilápia tolera grandes variações de temperatura, baixo nível de oxigênio dissolvido (LUCARELLI, 2006) e alta concentração de amônia na água (POPMA e PHELPS, 1998). A temperatura letal mais baixa e mais alta para esta espécie está em torno de 9°C e 42°C, respectivamente. (LIM e WEBSTER, 2006). As tilápias vivem perfeitamente em águas contendo 1,2 mg.L<sup>-1</sup> de oxigênio dissolvido, sendo relatada por Lim e Webster (2006), sobrevivência a concentrações menores que 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, para que haja um bom desenvolvimento, os valores ideais de oxigênio dissolvido estão acima de 5 mg.L<sup>-1</sup>. As tilápias suportam bem faixas de pH entre 5 e 9. Este parâmetro, juntamente com outros citados acima, como, taxas de oxigênio dissolvido e temperatura estão diretamente relacionados à toxicidade da amônia (LIM e WEBSTER, 2006). O aumento do pH da água acima do neutro promove a conversão de uma grande porcentagem do total da amônia da forma iônica (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) para a forma não iônica tóxica (NH<sub>3</sub>). Além disso, baixas taxas de oxigênio dissolvido e altas temperaturas (24°C a 32°C) podem aumentar a toxicidade da amônia. Em uma exposição prolongada (várias semanas) a concentração de amônia não ionizada maior que 1 mg.L<sup>-1</sup> pode causar mortes, especialmente em águas com baixas taxas de oxigênio dissolvido.

Durante este ensaio a temperatura da água e a oxigenação dos tanques mantiveram um valor médio ( $\pm$  desvio padrão) de 21,9°C  $\pm$  0,73 e 7,76 mg.L<sup>-1</sup>  $\pm$  0,25, respectivamente. O valores de pH observados durante o ensaio estavam compreendidos entre 7,63 e 7,81 e as taxas de amônia tiveram valores em

torno de  $0,71 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$ . Portanto, os parâmetros físico-químicos mantiveram valores favoráveis à saúde e sobrevivência dos animais, não sendo considerados fatores de interferência aos resultados obtidos.

Os animais utilizados neste ensaio apresentaram peso e idade correspondentes a animais que ainda não entraram em estágio de maturação sexual. Segundo Lim e Webster (2006) a maturação sexual é atingida aos 6 meses de idade, com peso aproximado de 40 gramas. Os animais utilizados neste experimento apresentaram comprimento médio igual a  $10,05 \text{ cm} \pm 1,11$  e peso corporal igual a  $17,36 \text{ g} \pm 5,57$ . Desta forma, foram controladas as possíveis influências hormonais nos resultados deste trabalho.

## **2. Alterações nucleares em eritrócitos**

As alterações nucleares observadas em eritrócitos têm sido consideradas por diversos autores como relevantes marcadores de danos genotóxicos (OSMAN et al., 2010; SUMMAK et al., 2010; AL-SABTI e METCALFE, 1995; ÇAVAS et al., 2005). Estes efeitos genotóxicos podem ser avaliados microscopicamente, com a observação de alterações na morfologia normal dos núcleos celulares. Neste trabalho foi possível observar as alterações bolha nuclear (BO), broto nuclear (BR), condensação nuclear (CO), fissura nuclear (FI), núcleo lobado (LO), micronúcleo (MN) e vacuolização nuclear (VA), as quais são raramente estudadas individualmente. LO, BO e FI foram as alterações mais frequentes em *O. niloticus*, tendo o cádmio como agente genotóxico. Çavas e Ergene-Gözükara (2003) avaliando o impacto de efluentes de fábrica têxtil em tilápias observaram uma diferente sequência, na qual a FI teve uma maior ocorrência que LO. Outra sequência foi obtida por

Jiraungkoorskul et al. (2008) que avaliou os efeitos do chumbo sobre tilápias e observou uma maior frequência de MN com 0,1% nos controles, e 1% nos afetados, seguido de FI, LO, BN e BO, apresentando frequências menores que as encontradas por Çavas e Ergene-Gözükara (2003). Chandra e Khuda-Buksh (2004) avaliando cádmio em *Oreochromis mossambicus* verificaram uma maior frequência de AN que de MN e Summak et al. (2010) que estudou o efeito do cádmio sobre *O. niloticus* mostrou que BO, LO e FI foram as alterações mais frequentes, seguidas de MN. Portanto, a sequência de ocorrência das ANEs parece estar mais relacionada com ao agente genotóxico que com a espécie utilizada.

A maioria dos trabalhos tem estudado MN separadamente das demais alterações, que em geral são reunidas em apenas um grupo, o das alterações nucleares (AN). Os trabalhos de Palhares e Grisolia (2002), Souza e Fontanetti (2006), Hoshina et al. (2008), Osman et al. (2010) e Muranli e Guner (2011), mostraram o aumento significativo de MN em eritrócitos de animais que receberam diferentes contaminantes (mitomicina, ciclofosfamida, efluentes de refinaria de petróleo e cepas patogênicas de fungos). O MN em nosso trabalho mostrou uma incidência muito baixa e não apresentou significância em nenhum tratamento. Fato similar foi descrito por Castaño et al. (1996) e Barbosa et al. (2010) que avaliando indução de MN por metais pesados, incluindo o cádmio em *Oncorhynchus mykiss* e *O. niloticus*, não observaram diferenças significativas nos valores de MN. Em *O. niloticus*, apesar de não terem sido verificadas diferenças significativas nas taxas de MN, um aumento nas taxas de células com quebras nas moléculas de DNA foram demonstradas pelo método Cometa (BARBOSA et al., 2010). Este aumento pode estar relacionado

com as outras alterações nucleares, que provavelmente não foram visualizadas pelo microscópio de luz.

A alteração nuclear BN (binucleada), induzida por efluentes ou soluções contendo cádmio tem sido observada em *O. niloticus* (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2003 e 2005, HOSHINA et al., 2008; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2008; SOUZA e FONTANETTI, 2006 e SUMMAK et. al., 2010) e em outras espécies de peixes (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; BARSIENE et al., 2006 e GUILHERME et al., 2008). Summak et al. (2010) relata a ocorrência de BN em *O. niloticus* expostos a soluções de metais contendo o cádmio na concentração de  $0,009 \text{ mg.L}^{-1}$ . Em nosso estudo, as BN não foram observadas em nenhum tratamento, portanto a não ocorrência desta alteração parece estar relacionada à concentração utilizada.

Em nosso trabalho as alterações nucleares foram analisadas também após a interrupção da contaminação, quando os animais foram transferidos para tanques contendo água limpa. Não existem relatos na literatura da análise das alterações nucleares eritrocíticas em conjunto e da avaliação da capacidade depurativa desses animais. De modo interessante algumas alterações parecem estar relacionadas negativamente ao total das ANEs e este dado mostra-se relacionado ao tempo e concentração utilizados.

Em nossos resultados, todas os grupos expostos ao cádmio (Cd-0,25 e Cd-2,5) apresentaram aumento significativo nas frequências de ANE, houve diferença apenas no tempo em que este aumento foi verificado. Na menor concentração de cádmio ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ), este aumento foi verificado depois de 96 horas de exposição, entretanto, na maior concentração o aumento das alterações aparecem em um menor tempo (48 horas). Çavas et al. (2005)

observou aumento nas frequências de MN e BN na concentração de cádmio ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) após exposição por 21 dias, não detectado por Barbosa et al. (2010). O tempo de exposição e a concentração de cádmio parecem estar diretamente relacionados ao aumento das alterações nucleares. Este fato também pode ser verificado através da diminuição na frequência de ANEs quando estes animais são retirados do contaminante. Os animais pertencentes aos grupos Cd-2,5 apresentaram a capacidade depurativa em 48 horas livre de contaminante e os animais pertencentes ao grupo Cd-0,25, apresentaram uma pequena diminuição nas frequências de ANEs, entretanto o tempo de 48 horas de depuração não foi suficiente para um resultado significativo.

Estes resultados indicam os efeitos do cádmio sobre a instabilidade gênica e o restabelecimento da estabilidade, quando os animais são retirados da contaminação.

A avaliação da influência de cada alteração na elevação ou diminuição das frequências de ANEs foi também relatada neste trabalho. LO foi a alteração que frequentemente influenciou os resultados da frequência total de ANEs. Em geral, esta alteração pode influenciar quando as frequências das alterações apresentaram queda (entre os tempos 96 e 144 do grupo Cd-2,5 e entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5 no tempo de 144 horas). LO foi observado influenciando a elevação da frequência apenas no tempo de 144 horas entre os grupos Ct e Cd-0,25, isto porque neste grupo não foi verificada capacidade depurativa significativa. No grupo Cd-2,5 a capacidade depurativa foi significativa e teve o LO como alteração que significativamente diminuiu neste período. A BO foi a alteração que aumentou no grupo Cd-0,25 entre os tempos de 48 e 96 horas e a VA teve sua frequência aumentada no tempo de 48 horas

entre os grupos Cd-0,25 e Cd-2,5. BO e VA parecem estar mais relacionadas ao aumento da frequência total, e as células contendo LO parece serem as células que vão diminuindo em número, quando estes animais são retirados da contaminação.

Estudos com células renais descrevem que estas respondem ao dano no DNA, parando o ciclo celular para facilitar a reparação do DNA ou sinalizando para morte por apoptose para eliminar células danificadas. A supressora de tumor p53 regula o dano no DNA, parando o ciclo celular em fase G2/M pela inibição de quinases dependentes de ciclinas (Cdk). Com isso, são ativados os sistemas de reparo, no qual o dano será revertido ou fixado por enzimas específicas, ou a se iniciará apoptose. Entretanto, o cádmio parece perturbar a conformação de p53, resultando na inibição de sua função. Portanto, a célula pode ou entrar em mitose ou iniciar a replicação do DNA, causando instabilidade gênica (BORK et al., 2010).

### **3. Estudo das populações sanguíneas por citometria de fluxo**

#### **3.1. Determinação das populações sanguíneas**

A técnica de citometria de fluxo para análise de células sanguíneas tem sido bastante utilizada nos últimos anos. Através deste método um grande número de células pode ser analisado rapidamente (CHILMONCZIK e MONGE, 1999). Entretanto, é necessário identificar a posição das células sanguíneas nos gráficos de dispersão adquiridos pelo citômetro de fluxo. Existem relatos na literatura de algumas espécies de peixes que tiveram suas células sanguíneas avaliadas pela citometria de fluxo (INOUE et al., 2002; TRAVER et al., 2003; LANGENAU e ZON, 2005; PETTERSEN et al., 2000; RONNESETH et al.,

2006), no entanto, nenhum trabalho descreve as células sanguíneas de *O. niloticus* sob este aspecto.

Através das técnicas utilizadas neste trabalho para determinação da posição das populações sanguíneas (separação por Ficoll e por decantação) foi possível identificar as diferentes populações de células do sangue de *O. niloticus*, através dos gráficos FSC x SSC. Linfócitos, trombócitos e granulócitos de *O. niloticus* apresentaram uma posição similar à apresentada por Inoue et al. (2002) em carpas (*Cyprinus carpio*), por Traver et al. (2003) e Langenau e Zon (2005) em peixe zebra (*Danio rerio*) e por Pettersen et al. (2000) e Ronneseth et al. (2006) em salmão (*Salmo salar* L.). Foi demonstrado nos trabalhos citados acima utilizando peixe-zebra uma posição semelhante dos eritrócitos nos gráficos de citometria de fluxo. Os eritrócitos do peixe-zebra apresentam o mesmo tamanho dos linfócitos e trombócitos e menor tamanho comparado aos granulócitos. Através de nossos resultados observamos eritrócitos e granulócitos com dimensões semelhantes. O trabalho de Witten et al. (1998), estabeleceu as dimensões das células sanguíneas de *O. niloticus* através de gradiente de Percoll, reações enzimáticas e imunocitoquímica. Através destas técnicas, as populações sanguíneas de *O. niloticus* foram definidas e estabelecidas suas medidas: cerca de 13  $\mu\text{m}$  de tamanho em granulócitos e eritrócitos e 6  $\mu\text{m}$  em linfócitos e trombócitos. Este dado corrobora nossos resultados e possibilita avaliar o comportamento destas células durante o ensaio genotóxico.

### **3.2. Análises das populações sanguíneas por citometria de fluxo**

Os percentuais de eritrócitos não variam muito entre os animais dos grupos expostos e não expostos ao cádmio em nenhum tempo utilizado. Foi observada uma menor taxa de eritrócitos no grupo Cd-0,25 em comparação com o grupo Cd-2,5 no tempo de 48 horas. Esta menor taxa aumenta durante os tempos de exposição e se torna significativa em 144 horas. Dados similares foram obtidos por Witeska (2005) no estudo quantitativo das populações sanguíneas de carpa (*Cyprinus carpio*) contaminadas por metais pesados. Neste trabalho foi verificado que os animais expostos ao cádmio não apresentavam alterações significativas em seus números de eritrócitos. De acordo com Witeska os parâmetros quantitativos dos eritrócitos são bastante estáveis e pouco sensíveis a fatores ambientais, devido às habilidades compensatórias do organismo dos peixes. Em nosso trabalho, esta menor taxa encontrada em 48 horas no grupo Cd-0,25 pode estar associada à morte e ou à retirada da circulação periférica de parte dessas células, uma vez que neste grupo também foi verificado um elevado número de eritrócitos Pi positivos neste tempo.

Os granulócitos apresentaram comportamentos diferentes entre os grupos de exposição. Em Cd-0,25 foi observado diminuição significativa de suas taxas em relação ao controle no tempo de 48 horas, entretanto, a partir desse tempo foi observado aumento tempo-dependente até 144 horas. No grupo Cd-2,5 não houve diferença significativa entre os tempos de exposição. Este grupo apresentou maiores taxas de granulócitos que o grupo Cd-0,25 no tempo de 48 horas. Esta resposta pode estar relacionada ao cortisol secretado durante a reação de estresse, aumentando as taxas de granulócitos nas

primeiras 24 horas de depuração por impedir a migração de granulócitos para os tecidos e aumentar sua estimativa de vida pela inibição da apoptose, ou através da atividade de enzimas antioxidantes (WITESKA, 2005).

Uchida et al. (2004) observou a redução das enzimas catalase e superóxido dismutase em eritrócitos expostos por longo tempo ao cádmio e o trabalho de Amer et al. (2005) indicou que o aumento do estresse oxidativo em células sanguíneas vem acompanhado por reduzidos níveis de glutathione (uma das maiores enzimas antioxidantes de ROS). Em sangue total de *O. niloticus* não foi observado aumento dos níveis de glutathione após exposição ao cádmio na ordem de 5, 10 e 20 $\mu$ M (ATLI e CANLI, 2008). Desta forma, a atividade das enzimas antioxidantes parecem não estar envolvidas na diminuição das alterações quando estes organismos estiverem contaminados por cádmio.

De acordo com Wu et al. (2007), a elevação do cortisol é um indicador de resposta primária ao estresse por cádmio, mas os valores de cortisol retornam aos níveis normais em poucos dias de exposição ao cádmio. O cortisol aumenta não para proteger contra o cádmio, mas contra as reações da defesa normal do organismo que podem comprometer a homeostase. Portanto, durante a exposição por 48 horas do grupo Cd-0,25, a diminuição no número de granulócitos pode estar associada à morte de parte dessas células ou à diminuição provável dos níveis de cortisol. No grupo de maior concentração, Cd-2,5, os animais não apresentam alterações significativas nos número dos granulócitos ao longo do tempo. Este fato pode ser parcialmente explicado através da ação do cortisol ser observada em tempo menor que o utilizado em nosso trabalho, uma vez que no trabalho de Wu et al. (2007), sob concentração

subletal de cádmio, foi verificado aumento de cortisol em até 5 horas de exposição e depois disso os níveis foram diminuindo.

De acordo com o trabalho de Witeska (2005), o cortisol pode diminuir o tempo de vida dos linfócitos, comprometendo sua atividade e promovendo sua apoptose. Em nosso trabalho os linfócitos / trombócitos apresentaram um comportamento inverso aos granulócitos. No grupo Cd-0,25 foi observado aumento em suas taxas em relação ao Ct no tempo de 48 horas, diminuição das taxas em 96 horas de exposição e manutenção dessa taxa entre os tempos de 96 e 144 horas. Enquanto que no grupo Cd-2,5 foi observado um comportamento semelhante ao grupo Cd-0,25, com diferença apenas entre os tempos de 96 e 144 horas, no qual foi verificada a diminuição nas taxas de linfócitos / trombócitos. O aumento do número dos linfócitos / trombócitos nas primeiras 48 horas é corroborado pelos resultados de Nussey et al. (2006), nos quais foram verificados aumento nos números de linfócitos em *O. mossambicus* durante a exposição aguda e crônica ao cobre. Este aumento foi provocado pela resposta dessas células às patologias provocadas por metais pesados. Portanto, a elevação das taxas em 48 horas de exposição pode estar relacionada à resposta destas células ao xenobiótico e diminuição nas taxas de linfócitos / trombócitos parece estar associada à morte de parte dessas células depois de 48 horas de exposição.

No grupo Cd-2,5, eritrócitos, granulócitos e linfócitos / trombócitos quando marcados por Pi apresentaram aumento nas taxas de células marcadas no tempo de 48 horas e diminuição nos tempos subsequentes. Entretanto, nos grupos Cd-0,25 de eritrócitos e granulócitos foi observada apenas a diminuição tempo-dependente e nos linfócitos / trombócitos não foi

verificada nenhuma alteração significativa em suas taxas. Mai et al. (2010) avaliaram os efeitos de um baixo pH (5.3) sobre células sanguíneas de *O. niloticus* e estabeleceu uma sequência de eventos de danos celulares quando estas são expostas a ambientes ácidos: indução do estresse oxidativo através de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação de lipídeos pela ação de ROS sobre os ácidos graxos, danos no DNA que podem ser irreversíveis levando à morte da célula. Além disso, foi observado que os danos no DNA avaliados por ensaio Cometa aumentaram nas primeiras 24 horas de exposição com diminuição subseqüentemente. O mesmo comportamento foi verificado nas taxas de células mortas, mostrando aumento nas primeiras 12 horas e diminuição nos demais tempos.

Bork et al. (2010), no estudo dos efeitos causado por cádmio em túbulos proximais dos rins, mostra que o cádmio (50 a 100  $\mu\text{M}$ ) induz dano no DNA de 1 a 6 horas de exposição. Esta indução está associada a um pico da formação de ROS de 1 a 3 horas de exposição. Cádmio também induziu parada no ciclo celular em fase G2/M em até 6 horas e este fato resultou em um aumento de 2x nas taxas de células em apoptose.

Ainda segundo Bork et al. (2010), a extensão do dano no DNA, determina que caminho a célula vai seguir. Se o reparo acontecer, enzimas específicas reverterem ou fixam os danos. Entretanto, se os danos forem maiores, o caminho deve ser a apoptose.

O somatório das alterações nucleares em eritrócitos apresentou comportamento semelhante aos resultados de eritrócitos marcados por Pi, principalmente na alteração de maior frequência LO, à qual está correlata. Este fato indica a existência de algum mecanismo de retirada destas células do

sistema circulatório, ocorrendo provavelmente por vias hemocateréticas, ainda que processos relacionados à reversão da alteração estrutural do núcleo, ou a progressão dos estados apoptóticos e necróticos ainda não estejam completamente descartados.

## CONCLUSÕES

- A microscopia de luz juntamente com a citometria de fluxo permitiu avaliar as alterações morfológicas no tecido sanguíneo de *O. niloticus*, sugerindo possíveis vias de resposta ao cádmio;
- A exposição ao cádmio nas condições utilizadas aumenta do total de ANEs em *O. niloticus* dependentes do período de exposição e da concentração aplicada;
- *O. niloticus* apresenta depuração das ANEs, quando retirados do contaminante, indicada principalmente pelas frequências obtidas para a alteração núcleo lobado (LO);
- Outras alterações morfológicas eritrocíticas, além do micronúcleo, refletem a exposição de *O. niloticus* de forma tempo e dose dependentes em relação ao cádmio;
- O tecido sanguíneo de *O. niloticus* exposto a cádmio apresenta grande aplicabilidade nos estudos dos processos de genotoxicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. *Draft toxicological profile for cadmium*. Atlanta, 454p, 2008.

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

ALAZEMI, B.M.; LEWIS, J.W.; ANDREWS, E.B. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environmental Technology*, v. 17, p. 225-238, 1996.

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

AMER, J.; GHOTI, H.; RACHMILEWITZ, E.; KOREN, A.; LEVIN, C.; FIBACH, E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *British Journal of Haematology*, v. 132, p.108-113, 2005.

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p.150-156, 2011.

ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 25, p. 33-38, 2008

AYYLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, G. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Paecilia latipinna*: An assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, v. 467 p.177-186, 2000.

BALCH, G.; METCALFE, C.; HUESTIS, S. Identification of potential fish carcinogens in sediment from Hamilton harbor, Ontario, Canada. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 14, p. 79-91, 1995.

BARBOSA J. S.; CABRAL T. M.; FERREIRA D. N.; AGNEZ-LIMA L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 320-325, 2010.

BARŠIENĖ, J.; DEDONYTĖ, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKĖENAITĖ, L.; ANDERSEN, O. K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*, v. 78, p. 99-104, 2006.

BENTSEN, H. B.; EKNATH, A. E.; VERA, M. S. P.; DANTING, J. C.; BOLIVAR, H. L.; REYES, R. A.; DIONISIO, E. E.; LONGALONG, F. M.; CIRCA, A. V.; TAYAMEN, M. M.; GJERD, B. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 160, n. 1/2, p. 145-173, 1998.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histological in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, v. 22, p. 25-34, 1999.

BEYERSMANN, D.; HECHTENBERG, S. Cadmium, Gene Regulation, and Cellular Signalling in Mammalian Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 144, p. 247-261, 1997.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, v.543, p. 251-272, 2003.

BORK, U.; LEE, W. K.; KUCHLER, A.; DITTMAR, T.; THÉVENOD, F. Cadmium-induced DNA damage triggers G2/M arrest via chk1/2 and cdc2 in

p53-deficient kidney proximal tubule cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, v. 298, p. 255-265, 2010.

BOUTILIER, R. G.; FERGUSON, R. A. Nucleated red blood cell function: metabolism and pH regulation. *Canadian Journal of Zoology*, v. 67, p. 2986-2993, 1989.

BUNTHOF, C. J.; VAN DEN BRAAK, S.; BREEUWER, P.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 3681-3689, 1999.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, v. 247, p. 295-311, 2000.

CANFIELD, P. J. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Australia Veterinary Journal*, v. 76, p. 793-800, 1998.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Ottawa, vol. 47, p. 2123-2136, 1990.

CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: Funep, 1992.

CASTAÑO, A.; CARBONELL, G.; CARBALLO, M.; FERNANDEZ, C.; BOLEAS, S.; TARAZONA, J. V. Sublethal Effects of Repeated Intraperitoneal Cadmium Injections on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 41, p. 29-35, 1998.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as

cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, v. 538, p. 81-91, 2003.

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

ÇAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, p. 569-574, 2005.

CELIK, A.; UNYAYAR, S.; CEKIÇ, F.O.; GÜZEL, A. Micronucleus frequency and lipid peroxidation in *Allium sativum* root tip cells treated with gibberellic acid and cadmium. *Cell Biology Toxicology*, v. 24, n. 2, p. 59-64, 2007.

CHANDRA, P.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Genotoxic effects of cadmium chloride and azadirachtin treated singly and in combination in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 58, p. 194-201, 2004.

CHEN, G.; WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research*, v. 567, n. 2-3, p.151-225, 2004.

CHILMONCZYK, S.; MONGE, D. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 9, p. 319-333, 1999.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics of North American Exotic Animal Practice*, v. 11, p. 445-462, 2008.

COSTA, P. M.; COSTA, M. H. Genotoxicity assessment in fish peripheral blood: a method for a more efficient analysis of micronuclei. *Journal of Fish Biology*, v. 71, p.148-151, 2007.

COSTA, P. M.; NEUPARTH, T. S.; CAEIRO, S.; LOBO, J.; MARTINS, M.; FERREIRA, M.; CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T. A.; COSTA, M. H. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environmental Research*, v. 111 p. 25-36, 2011.

DARZYNKIEWIC, Z.; S. BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; M.A. HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry*, v. 13, p. 795-808, 1992.

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

DUARTE, R. S.; PASQUAL, A. Avaliação do cádmio (Cd), chumbo (Pb), níquel (Ni) e zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. *Energia na Agricultura*, v 15, n. 1, 2000.

DYK, J. C.; PIETERSE, G. M.; VUREN, J. H. J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, p. 432-440, 2007.

ELLIS, A. E. Eosinophilic granular cells (EGC) and histamine responses to *Aeromonas salmonicida* toxins in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 9, p. 251-60, 1985.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; CELIK, A.; KÖLELI, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 48, p. 1-9, 2007.

FALCON, D. R. *β-glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração*. Tese de doutorado, Pós Graduação em Aqüicultura, Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticalbal. 158p. 2007.

FAVERNEY, C. R.; DEVAUX, A.; LAFURIE, M.; GIRARD, J. P.; BAILLY, B.; RAHMANI, R. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicology*, v. 53 p. 65-76, 2001.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. 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. *Mutagenesis*, v. 14 p. 605-612, 1999.

FILIPIČ, M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research*, 2011.

FILIPIČ, M.; HEI, T. K. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, v. 546, p.81-91, 2004.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J. *et al.* Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n. 2, p. 376-381, 2007.

GOERING, P.L.; WAALKES, M.P.; KLAASEN, C.D. Toxicology of cadmium. In: *Toxicology of metals: Biochemical aspects*. Berlin: Springer. p. 189-214, 1995.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA

damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, p. 138-143, 2009.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p. 235-239, 2000.

GROFF, J. M.; ZINKL, J. G. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish *Common carp* and gold fish. *Veterinary Clinics of North American Exotic Animal Practice*, v. 2, p. 741-776, 1999.

GUILHERME S.; VÁLEGA M.; PEREIRA M. E.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 70, p. 411-421, 2008.

HAMDANI, S. H.; MCMILLAN, D. N.; PETTERSEN, E. F.; WERGELAND, H.; ENDRESEN, C.; ELLIS, A. E. Isolation of rainbow trout neutrophils with an anti-granulocyte monoclonal antibody. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 63, p. 369-380, 1998.

HANSEN, J. A.; WELSH, P. G.; LIPTON, J.; SUEDEKAMP, M. J. The effects of long-term cadmium exposure on the growth and survival of juvenile bull trout (*Salvelinus confluentus*). *Aquatic Toxicology*, v. 58, p. 165-174, 2002.

HARTWIG, A. Role of DNA Repair Inhibition in Lead- and Cadmium-induced Genotoxicity: A Review. *Environmental Health Perspectives*, v. 102, p. 45-50, 1994.

HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. *Acta Scientiarum*, v. 21, n. 3, p. 733-737, 1999.

HINE, P. M.; WAIN, J. M.; BOUSTEAD, N. C. The leucocyte enzyme cytochemistry of fish. *New Zealand Fisheries Research Bulletin*, v. 28, p. 1-74, 1987.

HINE, P.M. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, v.2, p.79-88. 1992.

HOOFTMAN, N. R.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear abnormalities (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research*, v.104, p. 147-152, 1982.

HOSHINA, M. M.; ANGELIS. D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research*, v. 656, p. 44-48, 2008.

HUSSAIN, T.; SHUKLA, G.S.; CHANDRA. S. Y. Effects of cadmium on the superoxide dismutase and lipid peroxidation of liver and kidney on growing rats in vivo and in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, v. 60, p. 355-359, 1987.

IMAGAWA, T.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; KON, Y.; KUDO, N.; SUGIMURA, M. Morphology of blood cells in carp (*Cyprinus carpio L.*). *Journal of Veterinary Science*, v. 51, p. 1163-1172, 1989.

INOUE, T.; MORITOMO, T.; TAMURA, Y.; MAMIYA, S.; FUJINO, H.; NAKANISHI, T. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology*, v.13, p. 379-390, 2002.

ITO, T.; KERA, A.; MURATA, H.; YOSHIDA, T.; SASAKI, T.; YAMAUCHI, K.; YAMASAKI, Y.; YAMGUCHI, T.; UKAWA, M. Experimentally induced bacterial hemolytic jaundice of yellowtail and oxidative stress. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 66, p. 50-54, 2000.

ITO, T.; MURATA, H.; TSUDA, T.; YAMADA, T.; YAMAGUCHI, K.; UKAWA, M.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIDA, T.; SAKAI, T. Effects of a-tocopherol levels in extrusion pellets on in vivo lipid peroxidation levels and antioxidant activities in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* injected with the causative bacteria of fish jaundice. *Fish Science Journal*, v. 65, p. 679-683, 1999.

JÄRUP, L.; ÅKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 238, p. 201-208, 2009.

JEBALI, J.; BANNI, M.; GUERBEJ, H.; ALMEIDA, E.A.; BANNAOUI, A.; BOUSSETTA, H. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiology Biochemistry*, v. 32, p. 93-98, 2006.

JENSEN, A.; BRO-RASIRIUSSEN, F. Environmental cadmium in Europe. *Environmental Contamination Toxicology*, v. 125, p. 101-181, 1992.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; KANGWANRANGSAN, N.; ZAKARIA, S. The protective influence of ascorbic acid against the genotoxicity of waterborne lead exposure in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) *Journal of Fish Biology*, v. 73, p. 355-366, 2008.

JOSEPH, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* v. 238, p. 272-279, 2009.

KEEN, J. E.; STREELE, A. M.; HOUSTON, A. H. The circulating erythrocytes of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 94, p. 699-711, 1989.

KEITER, S.; KOSMEHL, T.; RASTALL, A.; ERDINGER, L.; WURM, K.; BRAUNBECK, T.; HOLLERT, H. Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in search for the causes for the decline of

fish catches in the upper Danube River. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 13, p. 308-319, 2006.

KLIGERMAN, A. D.; BLOOM, S. E.; HOWELL, W. M. *Umbra limi*, a model for the study of chromosome aberrations in fishes. *Mutation Research*, v. 31, p. 225-233, 1975.

KLIMOWICZ-BODYS M. D.; BATKOWSKI F.; OCHREM A. S.; SAVIČ M. A. Comparison of assessment of pigeon sperm viability by contrast-phase microscope (eosin-nigrosin staining) and flow cytometry (SYBR-14/propidium iodide (PI) staining) [evaluation of pigeon sperm viability]. *Theriogenology*, v. 77, p. 628-635, 2011.

KOHPOTH. M; RUSCLE, B.; NUSSE, M. Flow cytometric measurement of micronuclei induced in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste water. *Mutagenesis*, v. 14, n.4, p. 397-402, 1999.

LAMAS, J.; ELLIS, A. E. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 4, p. 201-219, 1994.

LANE, H. Nucleoside triphosphate changes during the peripheral lifespan of erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Zoology*, v. 231, p. 57-62, 1984.

LANE, H. C.; THARP, T. P. Changes on the population of ribosomal red cells of peripheral blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following starvation and bleeding. *Journal of Fish Biology*, v. 17, p. 75-81, 1980.

LANE, H. C.; WEAVER, J. W.; BENSON, J. A.; NICHOLS, H. A. Some age related changes of adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., peripheral erythrocytes separated by velocity sedimentation at unit gravity. *Journal and Fish Biology*, v. 21, p. 1-13, 1982.

LANGENAU, D. M.; ZON, L. I. The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nature Immunology*, v. 5, p. 307-317. 2005.

LIM, C.; WEBSTER, C. D. *Tilapia: Biology, Culture and Nutrition*. Editora The Haworth Press, Binghamton, NY, 681p., 2006.

LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F.; ALBURQUERQUE, C.; FREIRE, M.; MOREIRA, J. C. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of The Total Environment*, v. 339, p. 186-192, 2008.

LUCARELLI, A. C. T. *Biomarcadores de estresse oxidativo em tilápia do Nilo, Oreochromis niloticus (Teleostei; Cichlidae), expostas ao sulfato de cobre aquático*. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2006.

LUND, S. G.; PHILLIPS, M. C.; MOYES, C. D.; TUFTS, B. L. The effects of cell ageing on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 1039-1045, 2000.

MAI, W.; YAN, J.; WANG, L.; ZHENG, Y.; XIN, Y.; WANG, W. Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. *Aquatic Toxicology*, v. 100, p. 271-281, 2010.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 148-158, 2006.

MATSUYAMA, T.; IIDA, T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 23, p. 451-457, 1999.

MEAD, K. F.; BORYSENKO, M.; FINDLAY, S. R. Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, possesses cytophilic surface antibody with reaginic function. *Journal of Immunology*, v. 130, p. 334-40, 1983.

MENG, H.; TONNESEN, M. G.; MARCHESE, M. J.; CLARK, R. A.; BAHOU, W. F.; GRUBER, B. L. Mast cells are potent regulators of endothelial cell adhesion molecule ICAM-1 and VCAM-1 expression. *Journal of Cell Physiology*, v. 165, p. 40-53, 1995.

METCALFE, C.D.; BALCH, G.C.; CAIRNS, V.W.; FITZSIMONS, J.D.; DUNN, B.P. Carcinogenic and genotoxic activity of extracts from contaminated sediments in western Lake Ontario. *Science of The Total Environment*, v. 94, p. 125-141, 1990.

MIGLIARINI, B.; CAMPISI, A.M.; MARADONNA, F.; TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; SCARPONI, G.; CARNEVALI, O. Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Gobius niger*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 142, p. 241-247, 2005.

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 fresh water. *Mutation Research*, v. 367, p. 245-251, 1996.

MURANLI, F. D. G.; GÜNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation Research*, v. 726, p. 104-108, 2011.

NAGASAKA, R.; OKAMOTO, N.; USHIO, H. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 139, p. 259-266, 2004.

NIGAM S.; SCHEWE, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1488, p. 167-181, 2000.

NUSSE, M. & MARX, K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. *Mutation Research*, v. 392, p. 109-115, 1997.

NUSSEY, G.; VUREN, J. H. J.; PREEZ, H. H. Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 11, p. 381-388, 1995.

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*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 24-31, 2010.

PACHECCO, M.; SANTOS, M.A. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L., *Ecotoxicology and Environment. Safety*, v. 40, p. 71-76, 1998.

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

PASTORET, P. P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. Immunology of fishes. In: Paul-Pierre, P.; Philip, G.; Hervre, B.; André, G., editors. *Handbook of Vertebrate Immunology*. San Diego: Academic Press; 1998. p. 362.

PETTERSEN, E. F.; JERKNES, R. B.; WERGELAND, H. I. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using

specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 10, p. 695-710, 2000.

PHILLIPS, M. C. L.; MOYES, C. D.; TUFTS, B. L. The effect of cell aging on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells *Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 1039-1045, 2000.

POPMA, T.J. & PHELPS, R.P. Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling productions techniques. In: Simpósio Sul Americano de Aquacultura, .1, Recife. *Anais.*, Florianópolis: SIMBRAQ, 1998, p. 127.

PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, v. 97, p. 287-292, 2005.

POWELL, M. D.; BRIAND, H. A.; WRIGHT, G. M.; BURKA, J. F. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) intestinal eosinophilic granule cell (EGC) response to *Aeromonas salmonicida* and *Vibro anguillarum* extracellular products. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 3, p. 279-89, 1993.

POWELL, M. D.; WRIGHT, G. M.; BURKA, J. F. Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Cell and Tissue Research*, v. 266, p. 469-474, 1991.

PRATAP, H. B.; WENDELAAR BONGA, S. E. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and sodium, potassium-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquatic Toxicology*, v. 26, p. 133-150, 1993.

RAJAGURU, P.; SUBA, S.; PALANIVEL, M.; KALAISELVI, K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and

earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 41, p. 85-91, 2003.

RAMSDORF, W. *Utilização de duas espécies de Astyanax (Astyanax sp B e A. altiparana) com bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri- UFPR)*. 127 f. Dissertação. Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

REITE, O. B. Mast cell/Eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 7, p. 567-584, 1997.

REITE, O. B.; EVESON, Ø. Mast cells in the swim bladder of Atlantic salmon *Salmo salar*. Histochemistry and responses to compound 48/80 and formalin-inactivated *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 20, p. 95-100, 1994.

ROCCO, L.; FRENZILLI, G.; ZITO, G.; ARCHIMANDRITIS, A.; PELUSO, C.; STINGO, V. Genotoxic Effects in Fish Induced by Pharmacological Agents Present in the Sewage of Some Italian Water-Treatment Plants. *Environmental Toxicology*, v. 27, p. 18-25, 2010.

ROESIJADI, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 113, p. 117-123, 1996.

ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, v. 48, p. 185-194, 2000.

RØNNESETH, A.; PETTERSEN, E. F.; WERGELAND, H. I. Neutrophils and B-cells in blood and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 20, p. 610-620, 2006.

ROWLEY, A. F. The evolution of inflammatory mediators. *Mediators of Inflammation*, v. 5, p. 3-13, 1996.

SAKAI, T.; MURATA, H.; ENDO, M.; YAMAUCHI, K.; TABATA, N.; FUKUDOME, M. 2-Thiobarbituric acid values and contents of a-tocopherol and bile pigments in the liver and muscle of jaundiced yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, p. 1739-1740, 1989.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. R.; IZQUIERDO, E.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in Brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor fresh-water ecosystems. *Mutation Research*, v. 412, p. 219-225, 1998.

SANDSTROM, K.; HAKANSSON, L.; LUKINIUS, A.; VENGE, A. A method to study apoptosis in eosinophils by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, v. 240, p. 55-68, 2000.

SARKAR, S.; BHATNAGAR, D.; YADAV, P. Cadmium induced lipid peroxidation in rat liver slices: A possible involvement of hydroxyl radicals. *Toxicology In Vitro*, v. 8, p. 1239-1242, 1994.

SARKAR, S.; YADAV, P.; TRIVEDI, R.; BANSAL, A. K.; BHATNAGAR, D. Cadmium induced lipid peroxidation and the status of antioxidant system in rat tissues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 9, p. 144-149, 1995.

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

SCHROEDER T. M. *Investigation of bone marrow smears*, in: Vogel, F.; Röhrborn, G. (Eds.) *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, Springer, Freiburg, p. 214-219, 1970.

SEKHON, S. S.; BEAMS, H. W. Fine structure of the developing trout erythrocytes and thrombocytes with special reference to the marginal band and the cytoplasmic organelles. *American Journal of Anatomy*, v. 125, p. 353-374, 1969.

SHIGDAR, S.; HARFORD, A.; WARD, A. C. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 26, p. 731-736, 2009.

SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H.; PLUMB, J. A. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.58, p.181-190, 1997.

SLATER, T. F. Lipid peroxidation. *Biochemical Society Transection*, v. 10, p. 70-71, 1982.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*, v. 605, p. 87-93, 2006.

SPECKNER, W.; SCHINDLER, J. F.; ALBERS, C. Age-dependent changes in volume and haemoglobin content of erythrocytes in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Experimental Biology*, v.141, p. 133-149, 1989.

SUMMAK, S.; AYDEMIR, N. C.; VATAN, O.; YILMAZ, D.; ZORLU, T.; BILALOĞLU, R. Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2443-2447, 2010.

SVOBODOVA, Z.; VYKUSOVA, B. *Diagnostics, prevention and therapy of fish diseases and intoxication: Manual for International Training Course on Fresh-Water Fish Diseases and Intoxications: Diagnostics, Prophylaxis and Therapy*. Czechoslovakia, 270 p, 1991.

TALAPATRA, S. N.; DASGUPTA, S.; GUHA, G.; AUDDY, M.; MUKHOPADHYAY, A. Therapeutic efficacies of *Coriandrum sativum* aqueous extract against metronidazole-induced genotoxicity in *Channa punctatus* peripheral erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 3458-3461, 2010.

TAPPEL, A. L. Lipid peroxidation damage to cell components. *Federation Proceedings*, v. 32, p. 1870-1874, 1973.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-paque” de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, v. 19, n.1, p. 107-114, 2003.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, v. 121, p. 307-320, 2003.

TIANO, L.; BALLARINI, P.; SANTONI, G.; WOZNIAK, M.; FALCIONI, G. Morphological and functional changes in mitochondria from density separated trout erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1457, p. 118-128, 2000.

TIANO, L.; FEDELI, D.; BALLARINI, P.; SANTONI, G.; FALCIONI, G. Mitochondrial membrane potential in density-separated trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1505, p. 226-237, 2001.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuffs users, *American Journal Epidemiology*, v. 134, p. 840-850, 1991.

TRAVER, D.; PAW, B. H.; POSS, K. D.; PENBERTHY, T. W.; LIN, S.; ZON, L. I. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nature Immunology*, v. 4, n. 12, 2003.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 34, n. 5, p. 270-275, 1997.

UCHIDA, M.; TERANISHI, H.; AOSHIMA, K.; KATOH, T.; KASUYA, M.; INADERA, H. Reduction of erythrocyte catalase and superoxide dismutase activities in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Jinzu river basin, Japan. *Toxicology Letters*, v. 151, p. 451-457, 2004.

VALLEJO, A. N.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. In: FAISAL, M., HETRICK, F.M. (Ed.), *Ann. Review of Fish Diseases.*, v.2, p.73-89, 1992.

VALVERDE, M.; TREJO, C.; ROJAS, E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis*, v. 16, n. 3, p. 265-270, 2001.

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

VÁZQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes) *Tissue and Cell*, v. 39, p. 151-160, 2007.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *Journal of Immunology Methods*, v. 184, p. 39-51, 1995.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, v. 243, p. 167-190, 2000.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; LIRA, A. D.; ALMEIDA, T. R.; SANTOS, G. S. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nylo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n.8, p.1069-1074, 2008.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Food deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. *Journal of Experimental Biology*, v. 199, p. 2467-2475, 1996.

WAALKES M. P. & REHM, S. Chronic toxic and carcinogenic effects of cadmium chloride in male DBA/2NCR and NFS/NCr mice: strain-dependent association with tumors of the hematopoietic system, injection site, liver, and lung. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 23, p. 21-31, 1994.

WAISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, B.; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, v. 192, p. 95-117, 2003.

WHO – Cadmium Environmental Health Criteria, World Health Organization, 1992.

WITESKA, M. Stress in fish - Hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic Journal of Ichthyology*, v. 1, p. 35-41, 2005.

WITTEN, P. E.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putation phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. *Canadian Journal of Zoology*, v. 76, p. 310-319, 1998.

WONG, C.K.; WONG, M.H. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, v. 48, p. 517-527, 2000.

WRIGHT, D. A.; WELBOURN P. M. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environmental*, v. 2, n. 2, p.187-214, 1994.

WU, S. M.; SHIH, M. J.; HO, Y. C. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and physiology*, v. 145, p. 218-226, 2007.

ZAKOUR, R. A., KUNKEL, T. A., AND LOEB, L. A. Metal-induced infidelity of DNA synthesis. *Environmental and Health Perspective*, v. 40, p. 197-205, 1981.

ZINKL, J. G.; COX, W. T.; KONO, C. S. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comparative Haematology International*, v. 1, p. 187-195, 1991.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 241/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Análise dos aspectos morfológicos e genotóxicos induzidos por cádmio em *Oreochromis Niloticus (Pisces: Cichlidae)***", que tem como responsável(is) **José Dias Corrêa Junior**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **23/ 02/2011**.

Este certificado expira-se em **23/ 02/ 2016**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 241/2010**, related to the project entitled "**Analysis of morphological and genotoxic effects induced by cadmium in *Oreochromis Niloticus (Pisces: Cichlidae)***", under the supervisors of **José Dias Corrêa Junior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 23, 2011**.

This certificate expires in **February 23, 2016**.

Belo Horizonte, 25 de Março de 2011.

  
**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)