



Determinação de danos basais no DNA de araras canindé (*Ara ararauna*) através do Teste de Micronúcleos: uma ferramenta na avaliação da saúde animal e seu uso no biomonitoramento da poluição ambiental

Determination of basal damages in the DNA of araras canindé (*Ara ararauna*) through the Micronucleus Test: tool in the evaluation of the animal health and its use in the monitors of the ambient pollution

Valéria Rodrigues Pinhatti¹, Mariangela da Costa Allgayer²,
Adriana Schneider Breyer², Rosecler Alves Pereira² & Juliana da Silva¹

RESUMO

O Brasil se destaca pela sua grande biodiversidade em especial no que se refere à avifauna. Entre as espécies aviárias encontradas podemos citar a *Ara ararauna*, psitacídeo de ampla distribuição geográfica dentro do território nacional. Diversas patologias podem acometer estas espécies aviárias; porém os estudos com as aves brasileiras são bastante reduzidos. A exposição a diferentes agentes ambientais, como dejetos industriais, domésticos e agrícolas podem ser responsáveis pela causa de algumas patologias. Estes poluentes de origem antropogênica põem em risco a sobrevivência, a reprodução ou ainda o patrimônio genético dos organismos expostos através da indução de mutações. Devido à necessidade crescente de determinação de espécies que possam ser usadas como biomonitoras da genotoxicidade ambiental, além da preservação da biodiversidade, se teve por objetivo determinar os níveis basais de micronúcleos em *Ara ararauna*. Conforme o teste de micronúcleos realizado em 27 araras, verificou-se que a média de micronúcleos por ave é relativamente baixa (0,38/2000 células). Exemplos portadores de alterações patológicas apresentaram valores médios de 4,5 micronúcleos/2000 células. Além de se ter determinado seu padrão basal para futuras avaliações em saúde animal, observou-se também, que a utilização do teste de micronúcleos em *Ara ararauna* permite utilizá-las em atividades de biomonitoramento da poluição ambiental.

Descritores: *Ara ararauna*, Teste de Micronúcleos, biomonitoramento ambiental, saúde animal.

ABSTRACT

Brazil is known by its biodiversity, especially in terms of its avifauna. *Ara ararauna* is a psittacidae with large distribution within the national territory. Several pathologies can affect these bird species; however, the studies related to Brazilian birds are much reduced. The exposition of different environmental agents, like industrial, domestic and agricultural dejection, can be responsible for some of these pathologies. These pollutants with antropogenical origin endanger the survival, reproduction and also the genetic patrimony of the exposed organisms by the mutation induction. Due to the growing need of species that can be used as biomonitors of environmental genotoxicity, besides the biodiversity preservation, the objective of this paper was to determine the basal level of the micronucleus (spontaneous micronucleated erythrocytes) in *Ara ararauna*. In relation to the micronucleus test performed in 27 birds of the specie *Ara ararauna*, we verified that the average of micronucleus per bird is relatively low (0,38/2000 cells. Exemplars with pathologic changes present medium values of 4,5 micronucleus/2000 cells. Besides the basal pattern to be determined for future evaluation of animal health, it was verified that this specie could be used as monitors for genotoxic events.

Key words: *Ara ararauna*, Micronucleus Test, environmental monitoring, animal health.

INTRODUÇÃO

Na sociedade moderna cada vez mais se desenvolve produtos e tecnologias que acarretam em poluição. A contaminação por substâncias químicas pode afetar a sobrevivência, a reprodução ou ainda o patrimônio genético de organismos expostos, gerando mutações que podem iniciar o processo de carcinogênese [2]. A detecção de danos no DNA causados por contaminantes é de grande importância na conservação da diversidade das espécies, bem como na preservação do processo evolutivo [16].

Biomonitores são utilizados há muito tempo para alertar pessoas sobre ambientes que apresentam risco. Quando comparado ao método tradicional físico-químico, apresenta informação em relação à exposição cumulativa, além de detectar efeitos indiretos [14]. O organismo que utilizamos neste estudo foi a *Ara ararauna* uma espécie pertencente à família dos psitacídeos. Esta família está constituída por 78 gêneros e 332 espécies; sendo 148 pertencentes ao Novo Mundo, cerca de 100 ocorrendo na América do Sul e 80 espécies no Brasil, que é considerado o país mais rico em representantes desta família [15]. Graças à sua ampla distribuição geográfica, a determinação dos danos basais em seu DNA, pode auxiliar em futuras avaliações, em diferentes regiões, do impacto causado por poluentes ambientais, auxiliando em formulações de planos de manejo para conservação, bem como o uso da espécie como biomonitora. O presente trabalho teve por objetivo determinar níveis basais de micronúcleos nesta espécie e destacar sua utilidade como bioindicadores da poluição ambiental, contribuindo com ensaios de monitoramento ambiental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas 25 araras canindé (*Ara ararauna*) de ambos os sexos, jovens e adultos, clinicamente saudáveis do plantel do Criadouro Asas do Brasil, localizado em Novo Hamburgo, RS, e duas araras que apresentavam alterações clínicas.

Para colheita das amostras de sangue, as aves foram contidas manualmente com auxílio de puçá e luvas sendo posteriormente realizada contenção química com auxílio de anestesia volátil com Isoflurano como indicado por [6,12]. Foi obtido sangue em uma quantidade de até 1% do peso da ave através da punção da veia ulnar cutânea na superfície ventral da articulação úmero-radioulnar como recomendado para

aves acima de 100g por [5,11,12]. As amostras foram armazenadas em tubos Vacutainer® com EDTA (ácido etileno diamino tetra acetato de potássio) e refrigeradas para envio ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da ULBRA, onde foi determinado o perfil hematológico e realizada a confecção das lâminas para o teste de micronúcleos.

Para o teste de micronúcleos o sangue é colocado diretamente sobre a lâmina, sendo feito um esfregaço; as lâminas são secas em estufa 37°C; coradas com uma mistura de Giemsa (10%) e tampão fosfato pH 5,8; após são enxaguadas em água destilada, secas em temperatura ambiente e marcadas com um código numérico, para uma análise “cega”; seguindo o modelo zig-zag para evitar o cruzamento da mesma área mais de uma vez. Vários campos são observados ao acaso com lente de imersão. Foram contados de cada lâmina, sendo duas de cada animal, 1000 eritrócitos, analisando-se sempre a presença ou não de micronúcleos. Assim, de cada animal foram contados 2000 eritrócitos.

RESULTADOS

Neste trabalho, todos os indivíduos da espécie *Ara ararauna*, com exceção de dois exemplares com alterações patológicas, apresentaram resultados hematológicos com padrão normal, ou seja, animais clinicamente saudáveis. Na Tabela 1 podemos observar estes valores hematológicos e bioquímicos para 25 indivíduos, sendo 12 fêmeas e 13 machos.

Em relação ao teste de micronúcleos (Figura 1), observamos uma média de $0,38 \pm 0,57$ micronúcleos para cada 2000 eritrócitos analisados por ave. Podemos observar na Figura 2 os valores médios de micronúcleos para machos e fêmeas clinicamente saudáveis. Na ave com intoxicação por metais pesados (ASA 14 2002) foi demonstrado 4,0 micronúcleos/2000 células, e para a outra que apresentava insuficiência pancreática crônica e diabetes melito (ASA 158), o número de micronúcleos foi de 5,0 micronúcleos/2000 células (Figura 3).

DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem surgido grande interesse no desenvolvimento de técnicas que tornem possível o monitoramento de organismos cronicamente expostos a poluentes. O monitoramento do ambiente por sistemas biológicos, também chamados biomonitores

Tabela 1. Hematologia de indivíduos da espécie *Ara ararauna* (arara canindé).

Indivíduo	Sexo	Ht ^a (%)	Hb ^b (g/dL)	CHCM ^c (%)	Leucócitos (µL)	PPT ^d (g/dL)	Fibrinogênio
1	F	42	11,50	27,28	6700	2,63	0
4	F	41	11,20	27,32	4500	2,85	200
6	F	37	10,40	28,11	3500	3,01	0
7	F	43	11,10	25,81	4200	3,23	200
9	F	41	10,80	26,34	5400	2,85	0
28	F	37	11,10	30,00	5900	3,60	200
30	F	42	11,80	28,10	7900	3,80	0
33	F	43	11,70	27,20	3600	3,70	0
34	F	32	10,90	34,10	7200	3,50	200
35	F	45	12,30	27,30	4000	4,10	200
37	F	40	11,80	29,50	4800	3,70	400
39	F	45	12,70	28,20	7600	5,10	400
2	M	42	11,10	26,43	8600	3,05	0
3	M	41	10,80	26,34	5400	2,89	0
5	M	42	10,80	25,71	6300	3,01	0
8	M	38	10,10	26,58	5300	2,87	100
10	M	44	11,00	25,00	7200	2,99	200
26	M	45	11,80	26,20	4300	3,40	200
27	M	42	11,00	26,20	5800	3,70	200
29	M	38	10,60	27,90	5500	3,20	400
31	M	43	12,00	27,90	5900	3,40	200
32	M	48	12,30	25,60	5300	4,50	200
36	M	40	11,70	29,20	6000	4,60	200
38	M	44	11,90	27,00	3200	3,40	200
40	M	36	9,40	26,10	3200	4,90	0
Média		41,80	11,20	27,00	5397,30	3,60	145,90
Desvio Padrão		3,20	0,70	1,70	1761,50	0,60	128,20

^aHematócrito; ^bHemoglobina; ^cConcentração de Hemoglobina Corpuscular Média; ^dProteína plasmática total/Biureto.

ou biomarcadores, constituem métodos promissores para identificar danos causados ao ambiente e à saúde animal. Testes de genotoxicidade, incluindo monitoramento de populações em aves são de máxima importância para o conhecimento e prevenção de doenças. As aves são um dos melhores organismos utilizados para monitorar a qualidade do ar, por serem tão sensíveis quanto o homem ao monóxido de carbono [3]. Nas últimas décadas diferentes autores trazem relatos dos níveis de contaminação de aves silvestres de re-

giões industrializadas e rurais, por metais pesados a exemplo do mercúrio, clordane substância que contém nos pesticidas, cádmio, chumbo, zinco, etc. [7,17].

Neste estudo observou-se que as fêmeas e os machos das aves analisadas apresentavam valores similares dos parâmetros analisados e perfis hematológicos e bioquímicos dentro dos valores normais para psitacídeos conforme relatados por [1,8,9,10,13].

Avaliações correlacionando animais silvestres e mutagenese são escassas, e com aves quase inexistem

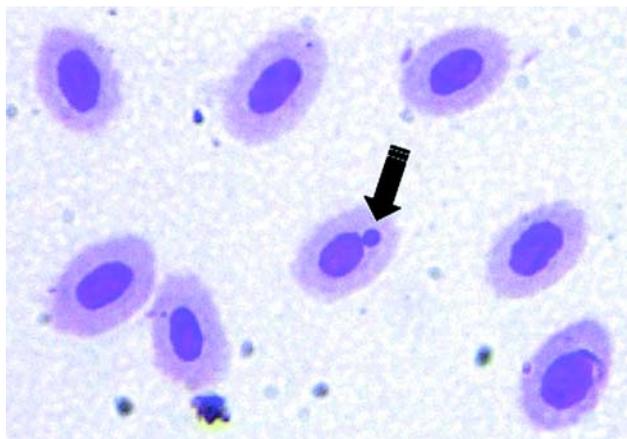


Figura 1. Eritrócitos de arara canindé com a visualização de um micronúcleo. A:1000x.

[4,19]. Foi possível determinar os padrões basais/espontâneos de micronúcleos para a espécie em questão, bem como verificar em dois espécimes diagnosticamente doentes o desvio deste valor. O valor médio basal de micronúcleos determinado para *Ara ararauna* foi de $0,38 \pm 0,57$, valor este inferior ao determinado para outras espécies de aves [20]. Assim, verifica-se ser a *Ara ararauna* uma espécie promissora para o biomonitoramento ambiental. O teste de micronúcleos tem sido amplamente utilizado em diversos animais, inclusive em mamíferos, a fim de detectar danos quimicamente induzidos [18,19]. Também cabe ressaltar que o Teste de Micronúcleos pode vir a ser utilizado como um biomarcador da saúde destes animais.

CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu a determinação da taxa basal de micronúcleos em araras canindé. Em avaliação preliminar, temos observado que o teste de micronúcleo associado a estas aves pode ser utilizado como

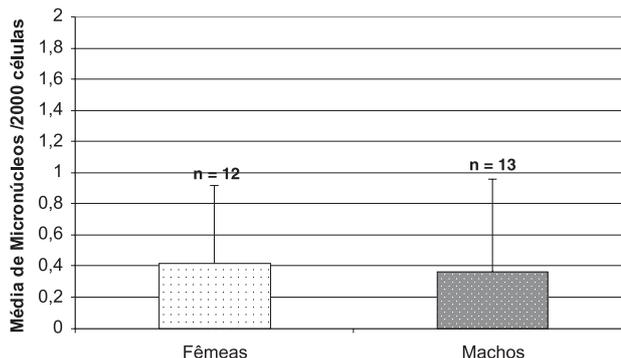


Figura 2. Quantidade média de micronúcleos das araras saudáveis.

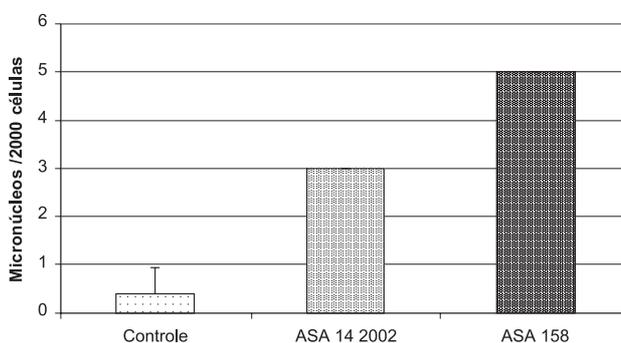


Figura 3. Micronúcleos das araras clinicamente saudáveis e com alterações clínicas: intoxicação por metais pesados (ASA 14 2002) e insuficiência pancreática exócrina (ASA 158).

indicador de saúde animal e alterações ambientais. Embora sejam necessários mais testes com aves desta espécie, que apresentem alterações clínicas, nossos dados permitem concluir a efetividade do uso desta espécie e da metodologia em avaliações de toxicologia ambiental.

Agradecimentos. Este trabalho teve suporte financeiro da ULBRA – Canoas/RS.

REFERÊNCIAS

- 1 Almeida F.M., Fedullo L.P.L. & Monsores D.W. 2001. Valores hematológicos de *Guarouba guarouba* (Ave-Psittacidae) em cativeiro. In: *X Congresso da Sociedade Paulista de Zoológicos*. Sociedade Paulista de Zoológicos. (São Paulo, Brasil). p.125.
- 2 Arnaiz R.R. 1997. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. *La Ciencia para Todos*. 2.ed. México: Fondo de Cultura Económica. 95p.
- 3 Peirce J.J., Weiner R.F. & Vesilind P.A. 1990. *Environmental pollution and control*. USA: Butterworth-Heinemann Press. 392p.
- 4 Butterworth F.M., Corkum L.D. & Guzmán-Rincón, J. 1995. Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of environmental change. *Environmental Science Research*. New York: Plenum Press. 50: 229-248
- 5 Campbell T.W. 1995. Avian hematology and cytology. Iowa: Iowa State University Press. pp.3-19.
- 6 Fudge A.M. 2000. Complete blood count. In: Fudge, A.M. *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp.09-18.

- 7 **Garcia-Fernandez A.J., Sanchez-Garcia J.A., Jimenez-Montalban P. & Luna A. 1995.** Lead and cadmium in wild birds in southeastern Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14: 2049-2058
- 8 **Garcia-Montijano M., Garcia A., Lemus J.A., Montesinos A., Canales R., Luaces I. & Pereira P. 2002.** Blood chemistry, protein electrophoresis, and hematologic values of captive spanish imperial eagles (*Águila adalberti*). *J. Zoo Wildl. Med.* 33:2: 112-117.
- 9 **Harper E.J. & Lowe B. 1998.** Hematology values in a colony of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and changes associated with aging. *J. Nutr.* 128: 2639-2640.
- 10 **Hauptmanová K., Literak I. & Bártošová E. 2002.** Haematology and Leucocytozoonosis of great tits (*Parus major* L.) during winter. *Acta Vet.* 71: 199-204.
- 11 **Martínez F.A. 2004.** Métodos de diagnóstico em psitacíformes. Disponível em <<http://www.portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle&artid=178>>. Acesso em: 07 de maio de 2004.
- 12 **Oglesbee B.L. 1998.** Distúrbios dos Animais de Estimação Aviários e Exóticos. In: Bichard, S.J.; Sherding, R.G. Manual Saunders: *Clínica de Pequenos Animais*. pp.1397-1404.
- 13 **Polo F.J., Peinado V.I., Viscor G. & Palomeque J. 1998.** Hematology and plasma chemistry values in captive psittacine birds. *Avian Dis.* 42, 3: 523-535.
- 14 **Silva J., Erdtmann B. & Henriques J.A.P. 2003.** Biomonitoring e biomarcadores. *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. pp.170-179.
- 15 **Sick H. 1997.** Ornitologia brasileira. 2.ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, pp.351-382.
- 16 **Spellerberg I.F. 1991.** *Monitoring Ecological Change*. Cambridge: Cambridge University Press. 334p.
- 17 **Stansley W. & Roscoe D.E. 1999.** Chlordane poisoning of birds in new jersey, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18: 2095-2099.
- 18 **Suzuki T., Hayashi M., Hakura A., Asita A.O., Kodama Y., Honma M. & Sofuni T. 1995.** Combination effects of clastogens in the mouse peripheral blood micronucleus assay. *Mutagenesis*. 10: 31-36
- 19 **Zúñiga G., Torres-Bugarín O., Ramírez-Muñoz M.P., Ramos A., Fanti-Rodríguez E., Portilla E., García-Martínez D., Cantú J.M., Gallegos-Arreola M.P. & Sánchez-Corona J. 1996.** Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Research* 369: 123-127.
- 20 **Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Zamora-Perez A., Gomes-Meda B.C., Ramos-Ibara M.L., Martínez-González S., González-Rodríguez A., Luna-Aguirre J., Ramos-Mora A., Ontiveros-Lira D. & Gallegos-Arreola M.P.** Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*. 494: 161-167.