

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DO TEGUMENTO DAS LARVAS DE PIRACANJUBA *BRYCON ORBIGNYANUS* (VALENCIENNES, 1849) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE, BRYCONINAE)

Cláudia Maria Reis Raposo Maciel¹, Alaor Maciel Júnior²,
Eduardo Arruda Teixeira Lanna³, Milane Alves Correa⁴, Lidiane da Silva Nascimento⁴

1. Prof^a D.Sc. do Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais / Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA (claudiaraposomaciel@yahoo.com.br).

2. Prof. D.Sc. do Departamento de Tecnologia Rural e Animal / Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA.

3. Prof. D.Sc. do Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

4. Graduanda do curso de Ciências Biológicas / Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA.

RESUMO

O tegumento é um sistema que exerce funções importantes, relacionadas principalmente com a proteção do organismo contra agressões do ambiente. Devido à importância ambiental, a qualidade de sua carne, crescimento rápido e homogêneo em cativeiro, a piracanjuba tornou-se economicamente interessante, contudo é uma das espécies da fauna brasileira em perigo de extinção. Para este estudo, utilizaram-se larvas, de zero a 172 horas após a eclosão (AE), que foram fixadas e submetidas ao processamento histológico de rotina e coradas com hematoxilina e eosina (HE), *alcian blue* (AB) e ácido periódico-Schiff (PAS). Nas larvas recém eclodidas, a cabeça e o corpo eram revestidos por delgado epitélio estratificado pavimentoso, e verificou-se a presença de células mucosas grandes, mas pouco numerosas. Nas horas seguintes, o epitélio tornou-se mais uniforme e o número de células mucosas permaneceu inalterado. A partir de 29 horas e 30 minutos AE, as células mucosas tornaram-se positivas para AB e negativas para PAS, ou seja, secretaram glicoproteínas ácidas carboxiladas, sugerindo uma imunoproteção. A presença de células mucosas na epiderme das larvas é considerada uma proteção contra abrasão. Durante o desenvolvimento de piracanjuba, poucas modificações foram verificadas no epitélio de revestimento. Alguns corpúsculos gustativos, achatados e nivelados com a superfície epitelial, foram encontrados na superfície do corpo dessas larvas.

PALAVRAS-CHAVE: células mucosas, corpúsculos gustativos, epitélio, ontogenia, Pisces

HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL FEATURES OF INTEGUMENT OF *BRYCON ORBIGNYANUS* (VALENCIENNES, 1849) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE, BRYCONINAE) LARVAE

ABSTRACT

The integument is a system that performs important functions, primarily related to protecting the body against environmental injuries. Because of environmental

importance, flesh quality, fast and homogeneous growth in captivity, the piracanjuba became economically attractive; however it is a species of Brazilian fauna in extinction risk. For this study, we used larvae from zero to 172 hours after hatching (AE), which were fixed and submitted to histological processing and stained with Hematoxylin and Eosin (HE), Alcian Blue (AB) and Periodic Acid Schiff (PAS). In the newly hatched larvae, the head and body were covered by thin stratified squamous epithelium, and there was a presence of large mucous cells, but not numerous. In the following hours, the epithelium became more uniform and the number of mucous cells remained unchanged. From 29 hours and 30 minutes AE, mucous cells became positive to AB and negative to PAS, i.e., secreted acidic carboxylated glycoproteins, suggesting an immune protection. The presence of mucous cells in the epidermis of larvae is considered a protection against abrasion. During the development of piracanjuba, few changes were observed in the epithelial lining. Some taste buds, flattened and in level with the epithelial surface, were found on the larvae body surface.

KEY WORDS: epithelium, mucosal cells, ontogeny, Pisces, taste buds

INTRODUÇÃO

O tegumento, as brânquias e o sistema digestório constituem interfaces importantes entre o corpo do peixe e o meio ambiente impedindo a entrada de organismos patogênicos (NAKAMURA et al., 2002). As superfícies destes tecidos são revestidas por muco, que é secretado por células epiteliais da epiderme e mucosas. Estudos relatam que este muco contém um conjunto de substâncias de defesa, como imunoglobulinas, lisozimas, proteases e lectinas, que fornecem propriedades de imunidade ao muco (ALEXANDER & INGRAM, 1992).

Formando um revestimento para o corpo dos vertebrados, o tegumento e seus anexos desempenham várias funções importantes, sendo sua função universal proteger o organismo das agressões físicas e químicas do ambiente (HÖFLING et al., 1995).

Devido à importância ambiental, excelente qualidade de sua carne, crescimento rápido e homogêneo em cativeiro, a piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, tornou-se economicamente interessante e tem despertado interesse de pesquisadores e produtores nos últimos anos. Entretanto, a piracanjuba é uma das espécies da fauna brasileira em perigo de extinção (IBAMA, 2004; BUCKUP et al., 2007), não sendo mais encontrada em vários trechos do rio Grande, decorrente da construção de um grande número de barragens hidrelétricas, que impedem sua migração reprodutiva, do desmatamento ciliar, da deterioração da qualidade da água provocada pela poluição ambiental e urbana, e da pesca predatória (FREATO et al., 2005). Desta forma estudos mais detalhados sobre esta espécie são relevantes para sua preservação (MACIEL et al., 2010).

Segundo MURGAS et al. (2003), além de existir grande interesse na utilização de piracanjuba para o repovoamento de reservatórios hidrelétricos e pisciculturas comerciais, o desenvolvimento da piscicultura com espécies nativas é de grande interesse para a conservação da biodiversidade e se constitui prioridade do IBAMA, de acordo com CONTE et al. (1995).

Este estudo teve como objetivo descrever características histológicas e histoquímicas do tegumento das larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*

Valenciennes, 1849 (Characiformes, Characidae, Bryconinae), de zero a 172 horas após a eclosão.

METODOLOGIA

Para este estudo, foram utilizadas larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae), oriundas da Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande – EPDA – VG, da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), em Conceição das Alagoas, MG, criadas em cativeiro, a $26,18 \pm 0,40$ °C e pH $6,62 \pm 0,17$.

Todo o trabalho foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos para o uso de Animais de Laboratório, publicado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

Foram coletados 15 a 20 exemplares a cada meia hora, a partir do momento da eclosão (zero hora) até 48 horas; após foram coletadas a cada hora até 72 horas, a partir desse momento, as coletas foram diárias até 172 horas após eclosão.

As larvas de piracanjuba foram fixadas em solução de Boiun, por seis a oito horas (MACIEL, 1997), e posteriormente transferidas para solução de álcool 70%, em que permaneceram até o momento do processamento histológico.

Os processamentos histológicos de rotina, inclusão em parafina e microtomia para confecção de lâminas histológicas, foram realizados no Laboratório de Morfofisiologia Animal Comparada do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), para análise do aspecto morfológico da pele, *alcian blue*, pH 2,5 (AB), para detectar células mucosas secretoras de polissacarídeos ácidos carboxilados, e ácido periódico-Schiff (PAS), para detectar células mucosas secretoras de glicoproteínas neutras e algumas ácidas, sulfomucinas (BANCROFT & STEVENS, 1996).

O comprimento padrão das larvas (CP), distância entre a extremidade rostral da cabeça e o pedúnculo da nadadeira caudal (NAKATANI et al., 2001), foi medido com paquímetro digital previamente ao processamento histológico.

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Imagens do Departamento de Zootecnia/UFV, com auxílio de fotomicroscópio de luz trinocular, acoplado a um microcomputador contendo um software de análise de imagens (Image Pro-Plus, versão 4.0).

As lâminas histológicas utilizadas neste trabalho encontram-se depositadas no acervo do Laboratório de Biologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus “Juvino Oliveira”, em Itapetinga, BA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas larvas recém eclodidas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), com $3,62 \pm 0,17$ mm de comprimento-padrão (CP), a região cefálica era revestida por um delgado epitélio estratificado pavimentoso, constituído por três camadas de células. Às duas horas após a eclosão (CP = $4,00 \pm 0,11$ mm), células mucosas escassas estavam visíveis no epitélio da região rostral da cabeça (Figura 1A). Às quatro horas após a eclosão (CP = $4,32 \pm 0,06$ mm), esse epitélio era continuado pelo epitélio dos lábios e constituído por uma camada intermediária de células cúbicas, com núcleo único, arredondado e central, e citoplasma róseo, nas preparações em HE, e as

camadas basal e superficial por células pavimentosas. Nas horas seguintes, o epitélio tornou-se mais uniforme e o número de células mucosas permaneceu inalterado (Figura 1B).

As células mucosas geralmente possuem um formato cubóide ou prismático; seu núcleo é oval e encontra-se pressionado junto à base da célula (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Segundo TWONGO & MACCRIMMON (1977), a presença de células mucosas na epiderme delgada e delicada das larvas, é uma proteção contra abrasão, que é requerida desde que a larva rompe o córion e é exposta ao ambiente de areia granulosa e cascalho do substrato.

De acordo com HINTON & LAURÉN (1999), o número e tamanho das células mucosas podem variar inter e intraespecificamente em função do ambiente. Essas células secretam muco, que, de acordo com WHITEAR (1986), tem função de lubrificação, facilitando o deslocamento do peixe na água.

Nas larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, às 15 horas após a eclosão (CP = $5,42 \pm 0,18$ mm), as células das camadas basal e superficial permaneceram inalteradas e as da camada intermediária eram poliédricas tendendo a cúbicas e aumentaram em tamanho (Figura 1C). Algumas células mucosas, menores que as anteriormente descritas e em maior número, foram encontradas entremeadas às células epiteliais, assim como os corpúsculos gustativos e neuromastos primários, que se dispunham através das quatro camadas epiteliais (Figura 1C).

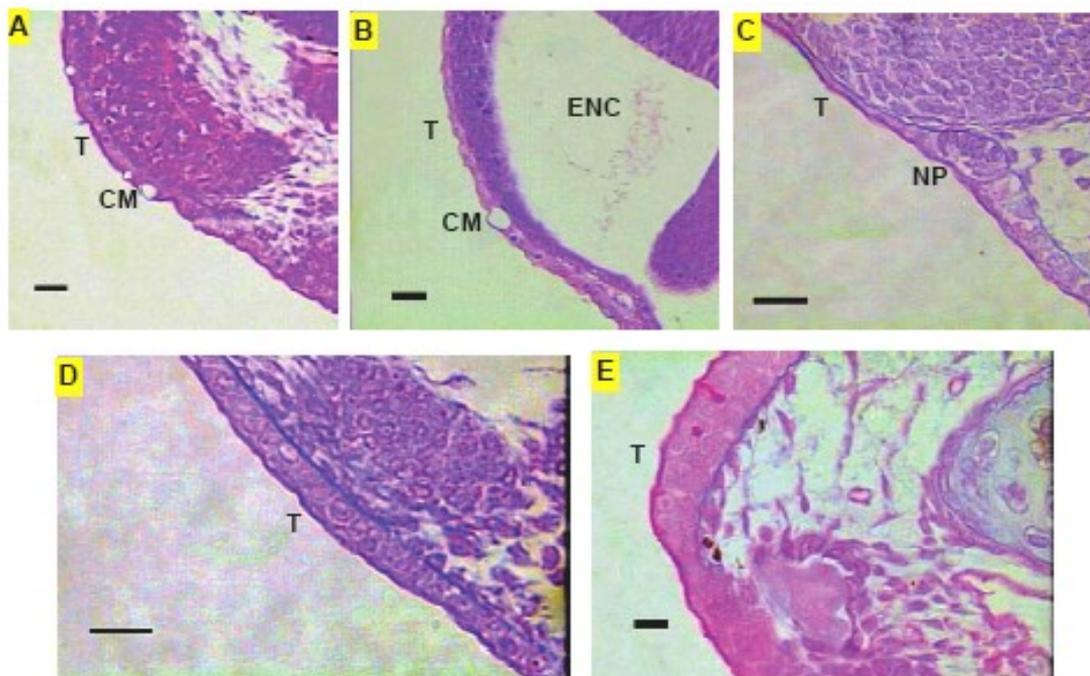


FIGURA 1. Tegumento da região cefálica das larvas de *Brycon orbignyanus*. Secções sagitais, HE. A) duas horas após a eclosão; B) seis horas após a eclosão; C) 15 horas após a eclosão; D) 37 horas após a eclosão; E) 56 horas após a eclosão. CM - célula mucosa; ENC – encéfalo; NP – neuromasto primário; T – tegumento. (Barras = 20 μ m).

Fonte: Autores.

De acordo com BONE et al. (1995), os corpúsculos gustativos cutâneos podem desencadear o comportamento de investida sobre a presa, embora o alimento possa ser rejeitado após a percepção na cavidade bucofaringiana.

Nas larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, às 37 horas após a eclosão (CP = $7,31 \pm 0,20$ mm), o tegumento estava ainda mais estruturado e uniforme (Figura 1D) e o número de células mucosas aumentou na porção dorsal da região cefálica.

Para GEORGE et al. (1998), o muco produzido pelas células mucosas é de suma importância para os peixes, uma vez que lubrifica a superfície da pele facilitando o deslizamento na água, além de servir como obstáculo à penetração dos parasitas e resistência às variações osmóticas.

Nos exemplares de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (CP = $8,50 \pm 0,50$ mm) com 56 horas após a eclosão, o número de camadas da epiderme que revestia a região cefálica variou entre quatro e cinco, sendo que, as camadas basal e superficial eram constituídas por células pavimentosas, e as intermediárias, por células cúbicas, com núcleo central (Figura 1E).

De acordo com ALVES & PINHO (1984), que estudaram a histologia da pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, as células epiteliais são unidas por um elemento viscoso intercelular. O estrato germinativo consiste de células colunares ou prismáticas, que originam novas células. A reprodução nesta camada ocorre como nos outros peixes, por divisão mitótica. A célula nova substitui aquela que lhe deu origem, enquanto a empurra para cima até alcançar a superfície, onde ocupa o lugar de outra célula que estava imprestável pelo uso ou dano. Segundo os autores, durante estes movimentos para a superfície, a célula passa por uma mudança química e gradualmente toma uma forma achatada ou escamosa. Na superfície ela finalmente morre e é eliminada. Esta descamação é um processo contínuo. Assim, toda a epiderme permanece viva, exceto na camada superficial das células que já completaram o seu percurso e são substituídas continuamente.

Nas larvas recém eclodidas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (CP = $3,62 \pm 0,17$ mm), o corpo era revestido por um epitélio estratificado pavimentoso, constituído por duas camadas de células, com núcleo grande e lentiforme. Verificou-se ainda nesse epitélio, a presença de células mucosas grandes, mas pouco numerosas no epitélio que reveste o corpo da larva (Figura 2A). A partir de 29 horas e 30 minutos após a eclosão (CP = $6,52 \pm 0,11$ mm), as células mucosas do epitélio corporal foram positivas para *alcian blue* e negativas para PAS, ou seja, secretaram glicoproteínas ácidas carboxiladas (Figura 2E), sugerindo a partir deste momento uma ação imunoprotetora.

Segundo JUNQUEIRA & CARNEIRO (2008), as células mucosas exibem características de células secretoras de muco, contendo glicoproteínas importantes para as funções lubrificantes, e a maioria dessas glicoproteínas pertence à família das mucinas, cuja estrutura contém 70-80% de cadeias de carboidratos.

COSTA et al. (2009) relataram que a população celular da epiderme é importante para a sobrevivência das larvas de peixe-rei marinho (*Odontotesthes argentinensis*). Segundo os autores, no tegumento, as células mucíparas ou mucosas possuem grande importância no mecanismo de defesa do organismo contra o pH marinho e estão presentes já no momento da eclosão. Segundo ODUM (1988), este tipo celular presente no início da vida livre larval pode estar relacionado

com o pH 8,2 da água do mar, desta forma, normalmente alcalino. Desta forma, tanto a acidez natural quanto a alcalinidade são fatores que podem determinar o estado de saúde dos peixes (ROBERTS, 1981). As células mucosas presentes na epiderme das larvas recém eclodidas de peixe-rei representam um mecanismo tampão importante sobre o pH ao qual as larvas estão sujeitas em ambiente marinho no meio de cultivo (COSTA et al., 2009).

Durante o desenvolvimento das larvas de piracanjuba, poucas modificações foram verificadas nesse epitélio que reveste o corpo sendo ainda delgado (Figuras 2A a 2E). Alguns corpúsculos gustativos foram encontrados na superfície do corpo ao longo do desenvolvimento dessas larvas, até 172 horas após a eclosão (CP = $11,94 \pm 0,80$ mm). Esses corpúsculos eram achatados e nivelados com a superfície epitelial.

De acordo com KAPOOR et al. (1975) e MACIEL (1997), os corpúsculos gustativos encontrados na epiderme corporal são homólogos aqueles verificados na cavidade bucofaringiana. Estes mesmos autores relataram que alguns peixes possuem a capacidade de realizar a gustação à distância, por meio dos corpúsculos gustativos presentes na epiderme corporal.

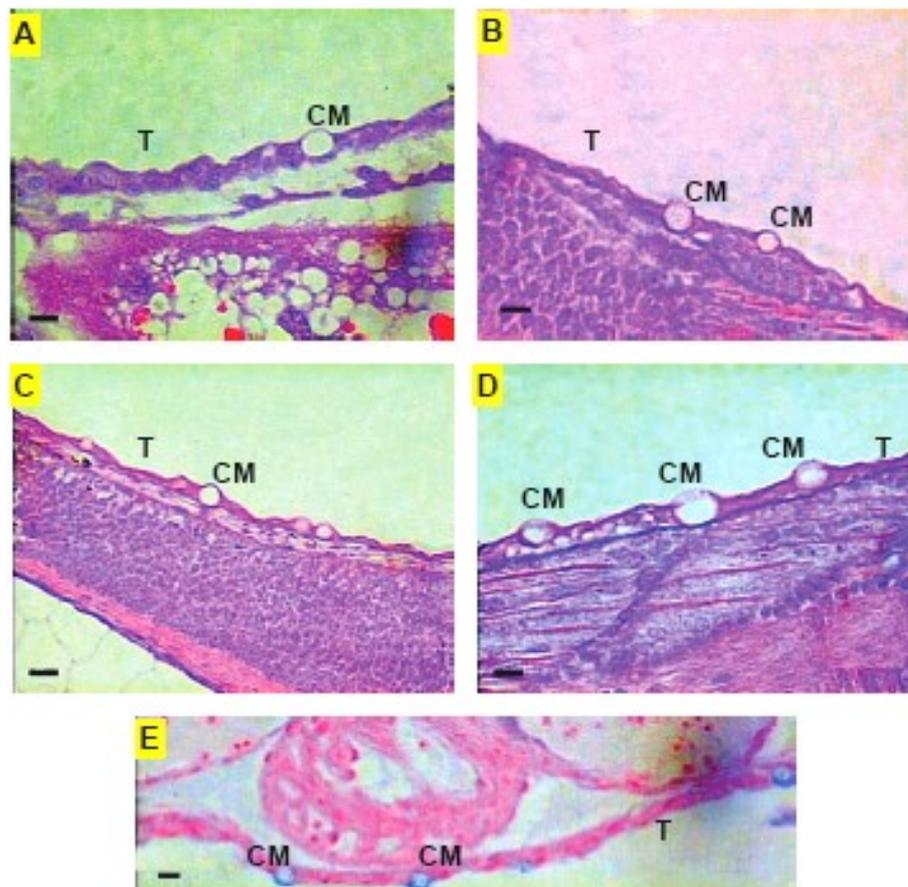


FIGURA 2. Tegumento corporal das larvas de *Brycon orbignyanus*. Secções sagitais. A) zero hora (HE); B) 20 horas após a eclosão (HE); C e D) 29 e 30 horas após a eclosão (HE); E) 29 horas e 30 minutos após a eclosão

(AB). CM – Célula mucosa; T – Tegumento. (Barras: A, B, D e E = 10 µm; C = 20 µm).

Fonte: Autores.

A espessura do tegumento apresentou variações dependendo da região do corpo das larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Figuras 1 e 2). O tegumento da região cefálica era mais espesso que o do tronco, em particular, foi espessando nas regiões das nadadeiras peitorais e do opérculo.

MACIEL (1997) verificou, nas larvas de trairão, *Hoplias lacerdae*, com um dia após a eclosão, que a epiderme corporal era formada por duas camadas de células pavimentosas com núcleo lentiforme, e com o desenvolvimento das larvas, observou-se aumento no número de camadas epiteliais, células mucosas e corpúsculos gustativos. MACIEL et al. (2010a) concluíram que as larvas vitelínicas de trairão, a partir de cinco dias após a eclosão, têm potencialidade para localizar o alimento à distância por meio da palatabilidade, uma vez que apresentam corpúsculos gustativos bem desenvolvidos na epiderme que reveste o corpo (gustação á distância), o que não foi verificado nas larvas de piracanjuba até 172 horas AE.

NAKAMURA et al. (2002) observaram que, nas larvas de *Conger myriaster*, a espessura do tegumento só aumentou após a metamorfose, tornando-se estratificado, assim como as células mucosas. LEONARD & SUMMERS (1976), que investigaram as alterações no tegumento de larvas de *Anguilla rostrata*, sugeriram que o aumento da espessura do tegumento parece estar estreitamente relacionado com uma mudança no habitat após a metamorfose, ou seja, pode ser uma adaptação ao novo habitat que exige uma maior proteção contra o desgaste e danos mecânicos.

CONCLUSÕES

Apesar das larvas de piracanjuba possuírem uma epiderme delicada, a proteção imediata da epiderme não é requerida quando a larva eclode, mas a partir de 29 horas e 30 minutos após a eclosão, proteção imune e contra abrasão passam a ser essenciais. Até 172 horas após a eclosão, as larvas de piracanjuba não desenvolveram a gustação à distância.

AGRADECIMENTOS

À Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) pela doação do material biológico e por primar pela preservação da fauna nacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J. B.; INGRAM, G. A. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. **Annual Reviews of Fish Diseases**, p. 249-279, 1992.

ALVES, M. I. M.; PINHO, A. J. F. Histologia da pele, brânquias e rim na interpretação da regulação iônica de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). **Ciências Agrônômica**, v. 15, n. 1/2, p. 143-149, 1984.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and Practices of Histological Techniques**. Churchill Livingstone, 4 ed., 1996. 166p.

BONE, Q.; MARSHALL, N. B.; BLAXTER, J. H. S. **Biology of Fishes**. 2. ed. London: Blackie Academic e Professional, 1995. 332 p.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 2007. 195p.

CONTE, L.; BOZANO, G. L. N.; FERRAZ de LIMA, J. A. Influência do sistema de alimentação no crescimento da piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, em gaiolas. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 8, p. 49-59, 1995.

COSTA, M. P. V.; SILVA, R. Z.; SAMPAIO, L. A.; COUSIN, J. C. B. Morfogenia larval microanatômica do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* (Atheriniformes, Atherinopsidae) do Rio Grande do Sul – Brasil: entre a eclosão e o 30º dia. **Biociências**, v. 17, n. 1, p. 91-105, 2009.

FREATO, T. A.; FREITAS, R. T.; SANTOS, V. B.; LOGATO, P. V. R.; VIVEIROS, A. T. M. Efeito do peso de abate nos rendimentos do processamento da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Ciências e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p.676-682, 2005.

GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. **Histologia Comparada**. 2 ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, v. 8, p. 51-66, 1999.

HÖFLING, E.; OLIVEIRA, A. M. S.; RODRIGUES, M. T.; ROCHA, P. L. B. **Chordata. Manual para Curso Prático**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1995. 246p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Anexo 1 – Instrução Normativa n. 5, de 21 de maio de 2004. Lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes ameaçados de extinção com categorias da IUCN**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br>. (Acessado em 31/05/2010).

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KAPOOR, B. G.; EVANS, H. E.; PEVZNER, R. A. The gustatory system in fish. **Advances in Marine Biology**, v. 13, p. 53-108, 1975.

LEONARD, J. B.; SUMMERS, R. G. The ultrastructure of the integument of the American eel, *Anguilla rostrata*. **Cell and Tissue Research**, v. 171, p. 1-30, 1976.

MACIEL, C. M. R. R. **Morfologia e potencialidade de *Hoplias cf lacerdae* (Ribeiro, 1908) (Characiformes, Erythrinidae) para localizar e selecionar o alimento, nas fases iniciais do ciclo de vida.** 1997. Viçosa, MG: UFV, 96p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

MACIEL, C. M. R. R.; MACIEL JUNIOR, A.; MENIN, E. Potencialidade de trairão para localizar o alimento á distância nas fases iniciais do ciclo de vida. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 20. Palmas, TO. **Anais...** p.1-4. 2010a.

MACIEL, C. M. R. R.; LANNA, E. A. T.; MACIEL JÚNIOR, A.; DONZELE, J. L.; NEVES, C. A.; MENIN, E. Morphological and behavioral development of the piracanjuba larvae. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 961-970, 2010.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermiática pós-congelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6 (supl.2), p. 1810-1814, 2003.

NAKAMURA, O.; SAEKI, M.; KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; WATANABE, T. Development of epidermal and mucosal galectin containing cells in metamorphosing leptocephali of Japanese conger. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 822-833, 2002.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G. et al. **Ovos e Larvas de Peixes de Água Doce: Desenvolvimento e Manual de Identificação.** Maringá: EDUEM, 2001. 378p.

ODUM, E. P. **Ecologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1988. 434p.

ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces.** Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 369p.

TWONGO, T. K.; MacCRIMMON, H. R. Histogenesis of the oropharyngeal and oesophageal mucosa as related to early feeding in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Canadian Journal of Zoology**, v. 55, p. 116-128, 1977.

WHITEAR, M. The skin of fishes including cyclostomes: Epidermis. In: BEREITER-HAHM, J. et al. (Ed.). **Biology of the Integument, Vertebrates.** Berlin: Springer, v. 2, p. 9-64. 1986.