

TATIANE KLINGELFUS



**DANOS NO DNA EM TECIDO RENAL DE *Rhamdia quelen* (SILURIFORME)  
SUBMETIDA À CONTAMINAÇÃO SUBCRÔNICA VIA TRÓFICA POR SULFATO  
DE ALUMÍNIO**

Monografia apresentada à disciplina BG015 do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2012

TATIANE KLINGELFUS

**DANOS NO DNA EM TECIDO RENAL DE *Rhamdia quelen* (SILURIFORME)  
SUBMETIDA À CONTAMINAÇÃO SUBCRÔNICA VIA TRÓFICA POR SULFATO  
DE ALUMÍNIO**

Monografia apresentada à disciplina BG015 do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2012

*Todo grande progresso da ciência resultou  
de uma nova audácia da imaginação.*

*John Dewey*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, pela oportunidade, pela confiança no meu trabalho e por incentivar o desenvolvimento profissional científico.

À Dr.<sup>a</sup> Paula Moiana da Costa, por aceitar a realização da minha iniciação científica em seu projeto de doutorado, colaborando com este trabalho.

Ao aluno Marcos Scherer, pelo auxílio como estagiário.

Aos professores membros da banca de avaliação, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Íris Hass e Ms.<sup>a</sup> Taynah Vicari por enriquecerem o trabalho.

A todos os meus amigos do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental.

Aos meus familiares, que me apoiaram em todos os momentos da graduação.

## RESUMO

O alumínio é o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre e é utilizado em diversas atividades, como utensílios de cozinha, recipientes e em processos técnicos industriais. Porém, as informações sobre sua toxicidade ainda são escassas. O trabalho teve por objetivo avaliar o potencial genotóxico do sulfato de alumínio em tecido renal de *Rhamdia quelen*, contaminada via trófica. Um total de 11 peixes por grupo foram submetidos à contaminação por sulfato de alumínio misturada à gelatina e ração, durante 60 dias, nas concentrações 5 mg/kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg, e paralelamente a um controle negativo. Amostras do rim posterior foram retiradas para a realização das técnicas de obtenção de metáfases mitóticas e do ensaio cometa. Foram encontrados três tipos de aberrações cromossômicas, caracterizadas como quebras de cromátide, descondensações da região telomérica e separação precoce de cromátides-irmãs. O teste de aberrações cromossômicas indicou um potencial genotóxico do sulfato de alumínio nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg, considerando o total de alterações estruturais nos cromossomos. Possivelmente a dose de 500 mg/kg do contaminante provocou maior dano ao tecido, não sendo possível verificar diferença em relação ao controle negativo. Foi observada maior frequência de descondensação na dose de 5 mg/kg, comparando os três tipos de aberrações em cada dose. Na comparação entre as três doses por tipo de aberração, separadamente, observou-se maior frequência de separação precoce de cromátides nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg, e uma tendência de maior frequência de descondensação da região telomérica. Sugerimos que, as aberrações cromossômicas encontradas, possivelmente ocorreram devido à influência do sulfato de alumínio na estrutura de proteínas e mobilidade dos cromossomos durante o processo de mitose. Com o ensaio cometa, sendo este mais sensível, foi possível confirmar a genotoxicidade do sulfato de alumínio no tecido renal de *Rhamdia quelen* nas três doses testadas. Porém, não foi observada uma relação dose-resposta.

**Palavras-chave:** aberrações cromossômicas, ensaio cometa, peixe.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i> .....	3
<b>FIGURA 2.</b> Exemplar condicionado a receber alimentação em dose única e individual. ....	4
<b>FIGURA 3.</b> Cromossomos mitóticos de <i>Rhamdia quelen</i> (2N = 58) submetida à contaminação com sulfato de alumínio. ....	9
<b>FIGURA 4.</b> Comparação da frequência total de aberrações cromossômicas (CA) entre os tratamentos. ....	13
<b>FIGURA 5.</b> Comparação da frequência dos tipos de aberrações cromossômicas (CA).....	14
<b>FIGURA 6.</b> Comparação da frequência de separação precoce de cromátides (A) e comparação da frequência de descondensações (B), entre os tratamentos. ....	15
<b>FIGURA 7.</b> Comparação de danos no DNA pelo ensaio cometa entre os tratamentos. ....	17

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
2.1 Desenho Experimental.....	4
2.2 Amostras.....	5
2.3 Teste de Aberrações Cromossômicas.....	5
2.4 Ensaio Cometa .....	6
2.5 Análise Estatística .....	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18
ANEXOS .....	24

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da disposição de resíduos no ambiente ocorre principalmente através da industrialização e da necessidade de aumento dos recursos espaciais e tecnológicos, disponibilizando grande diversidade de produtos químicos que são potencialmente tóxicos (ZAGATTO, 2006).

O alumínio é o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre (NAYAK, 2002) e está presente em pequenas quantidades em vários alimentos (KOIVISTOINEN, 1980). Pequenas quantidades são liberadas por utensílios de cozinha, e são dissolvidos na comida, particularmente quando o alimento é ácido. Além disso, compostos de alumínio são comumente utilizados em purificação de água (LIONE, 1983). Compostos de alumínio são usados ainda em um grande número de processos técnicos, como, por exemplo, catalisadores em indústrias químicas, em indústrias de papel, tingimento de têxteis, entre outros (GANROT, 1986). As informações relacionadas à toxicidade do alumínio são escassas (LANKOFF *et al.*, 2006).

A toxicidade dos metais é um problema extremamente complexo (GUTHRIE & PERRY, 1980; HAMOND & BELILES, 1980). Relaciona-se com pelo menos três tipos de influência: bloqueio de grupos funcionais essenciais à atuação de uma biomolécula, deslocamento de outros metais presentes no sistema e modificações na conformação de sítios ativos e na estrutura quaternária de proteínas. Em pelo menos alguma forma ou em algumas condições ambientais, muitos metais são capazes de induzir tumores ou interagir com material genético (COSTA, KRAKER & PATIERNO, 1984; KAZANTZIS & LILLY, 1986; NORSETH, 1988; WOO *et al.*, 1988).

A genética toxicológica trata do estudo de substâncias que podem danificar o DNA e os cromossomos das células. Esses danos são usualmente medidos como mutações gênicas, aberrações cromossômicas, quebras de fita e aductos de DNA, ou ainda como interferência com os mecanismos envolvidos no reparo destes danos. Algumas destas substâncias são chamadas de aneugênicas, pois atuam provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular dando origem a alterações cromossômicas numéricas. Outras são chamadas de clastogênicas e induzem quebras e alterações na estrutura dos cromossomos. Em qualquer dos casos é possível avaliar, através de testes



genotóxicos, os possíveis efeitos de um determinado composto (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

A utilização de biomarcadores pode avaliar a toxicidade de poluentes que atuam em diversos níveis de complexidade, sendo possível monitorar perturbações que ocorrem a nível molecular e celular, assim como em populações ou comunidades (KENDALL *et al.*, 2001).

A formação de aberrações cromossômicas é um processo celular complexo e não completamente compreendido nas áreas de estudo de genética molecular ou a nível ultraestrutural (PALITTI, 1998). Porém são microscopicamente visíveis e podem representar parte de um amplo espectro de alterações no DNA gerados por diferentes mecanismos (OBE *et al.*, 2002).

O ensaio cometa é uma ferramenta interessante por sua capacidade de demonstrar o potencial genotóxico de substâncias químicas, sendo um ensaio rápido, sensível e relativamente barato (PROVOST *et al.*, 1993; SINGH & STEPHENS, 1997; BELPAEME *et al.*, 1998). Em peixes, os tecidos sanguíneo, hepático, branquial e renal são os mais utilizados para o teste do ensaio cometa (BELPAEME *et al.*, 1998; FERRARO *et al.*, 2003; RAMSDORF *et al.*, 2009; GHISI *et al.*, 2011; RAMSDORF *et al.*, 2011; BENINCÁ *et al.*, 2012).

A utilização de peixes como bioindicadores permite a detecção precoce de efeitos dos poluentes no ambiente (FRENZILI *et al.*, 2004). Peixes apresentam diversas vantagens em estudos ecotoxicológicos, sendo o grupo mais diverso entre os vertebrados, além de possuírem alta relevância ecológica à exposição de substâncias tóxicas (POWERS, 1989). Podem apresentar respostas semelhantes a outros vertebrados, inclusive humanos (AL-SABTI e MELTCALFE, 1995), e servem, ainda, como fonte alimentar para populações humanas (CAMARGO e POUEY, 2005; FAO, 2010). A espécie de peixe *Rhamdia quelen* (Jundiá) vem sendo utilizada por diversos autores como um eficiente bioindicador na avaliação de genotoxicidade de diversas classes de xenobióticos (FERRARO *et al.*, 2009, PIANCINI, 2011, RAMSDORF *et al.*, 2011, GHISI *et al.*, 2011, PAMPLONA *et al.* 2011; COSTA, 2011)

O objetivo deste trabalho foi avaliar a genotoxicidade do sulfato de alumínio em tecido renal de *Rhamdia quelen*. Utilizou-se o teste de aberrações cromossômicas para a detecção de efeitos clastogênicos, e o ensaio cometa para

danos mais sensíveis ao DNA. A contaminação foi realizada via trófica subcrônica, sendo este tipo de exposição comum em animais predadores, inclusive o homem.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Desenho Experimental

Os exemplares de *Rhamdia quelen* (Figura 1) utilizados foram obtidos de uma piscicultura que não apresentava histórico de contaminação. Os animais foram aclimatados por aproximadamente 30 dias em tanques de 100 litros, e posteriormente separados em aquários de 18 litros (dois exemplares por aquário) para a realização dos bioensaios. As condições foram padronizadas, sendo a temperatura mantida em torno de 28-29°C com aeração constante. Os peixes foram primeiramente condicionados a receber alimentação em doses únicas e individuais de ração comercial preparada com gelatina sem sabor (Dr. Oetker ®), e posteriormente foi adicionada a esta preparação o sulfato de alumínio. Os jundiás foram alimentados a cada três dias, durante 60 dias (Figura 2), perfazendo um total de 20 doses. Um total de 11 exemplares por grupos foram submetidos à contaminação nas concentrações de 5mg/kg, 50mg/kg e 500mg/kg de sulfato de alumínio. O grupo controle negativo recebeu apenas ração com gelatina e foi realizado paralelamente aos grupos contaminados.

**FIGURA 1.** Exemplar de *Rhamdia quelen*.



Fonte: O autor.

**FIGURA 2.** Exemplar condicionado a receber alimentação em dose única e individual.



Fonte: Dr.<sup>a</sup> Paula Moiana da Costa, Departamento de Genética – UFPR.

## 2.2 Amostras

Cada exemplar de jundiá foi anestesiado com benzocaina a 20% (GONTIJO *et al.*, 2003), e em seguida pesados, medidos e sexados. Foi feita uma incisão a partir do poro urogenital até aproximadamente à nadadeira peitoral. Uma porção do rim posterior foi retirada com o auxílio de uma pinça e colocada imediatamente em uma placa de Petri, contendo 5 ml de meio de cultura RPMI adicionada de 20% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico-antimicótico, para a realização da técnica de obtenção de metáfases mitóticas. Outra porção do rim posterior foi extraída e colocada em microtubos contendo 1 ml de soro bovino fetal, que foram mantidos no gelo e na ausência de luz. Esse tecido foi posteriormente desagregado, com a finalidade de obter uma suspensão celular para o ensaio cometa.

## 2.3 Teste de Aberrações Cromossômicas

Para a obtenção das metáfases utilizou-se o método indireto segundo Fenocchio (1991), com modificações.

Após dissecação do peixe, uma porção de aproximadamente 3 mm do rim posterior foi retirada e colocada em placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura (10,40 g/L de meio RPMI 1640, 10 ml/L de penicilina/estreptomicina com antimicótico, 20% de soro bovino fetal, pH 7,4). A porção do tecido foi desagregada com pinças e posteriormente com seringa desprovida de agulha, sendo obtida uma

suspensão celular. Esta foi, então, transferida para frascos de cultura de tecidos e permaneceu durante 6 horas em estufa a 29°C. Ao finalizar o tempo, adicionou-se 34 µL de colchicina 0,025%. A cultura foi homogeneizada suavemente, permanecendo em estufa a 29°C por 45 minutos. Após esta etapa, as células foram resuspendidas com pipeta de Pasteur e o material transferido para um tubo de ensaio, ao qual foi centrifugado a 900 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e o material foi submetido à etapa de hipotonização (10 ml de KCl 0,075M), deixando a amostra homogeneizada em estufa à 37°C por 45 minutos. Decorrido o tempo, o material foi resuspenso e realizou-se a pré-fixação, adicionando 2 ml de fixador (Metanol: Ácido Acético 3:1). Novamente realizou-se o processo de centrifugação. O sobrenadante foi descartado, e realizaram-se três repetições da etapa de fixação, adicionando 10 ml de fixador, homogeneizando o material e centrifugando cada vez. Ao fim da última etapa de fixação, foi adicionado 2 ml de fixador, e guardou-se o material em microtubos à -20°C até à preparação das lâminas. Duas a três gotas da amostra foram pingadas em lâmina histológica aquecida a 54°C e coradas com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato (pH 6,8), por 10 minutos. Buscou-se até 50 metáfases por amostra, analisando visualmente as aberrações cromossômicas do tipo estruturais.

## **2.4 Ensaio Cometa**

A técnica utilizada para o Ensaio Cometa foi descrita por Speit e Hartmann (1999) com modificações segundo Ferraro *et al.* (2004) e Ramsdorf *et al.* (2009). O tecido foi homogeneizado em microtubos contendo 1 ml de soro bovino fetal, e, 12 µl da suspensão celular foram diluídos em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP), e colocado em uma lâmina previamente coberta com agarose normal (NMP). As lâminas foram submersas em solução de lise (solução de lise estoque: NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8 %), N-lauril-sarcosinato (1%); solução de lise uso: triton X100 (1%), DMSO (10%) na solução de lise estoque), por 72 h a 4°C. Na etapa seguinte, as lâminas foram primeiramente imersas em tampão de eletroforese (NaOH (10 N) ; EDTA (200 mM), pH 13) por 25 minutos para efetuar a desnaturação do DNA, e posteriormente submetidas à eletroforese a 300mA, 25V por 25 min. Após a neutralização em Tris 0,4M, pH 7,5 e fixação no álcool etílico absoluto por 5 min, as lâminas foram coradas com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e

analisados em microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Cem nucleóides por espécime foram classificados visualmente como pertencendo a uma das cinco classes predefinidas, conferindo valores de 0 (sem danos) a 4 (dano máximo) (COLLINS, 1997).

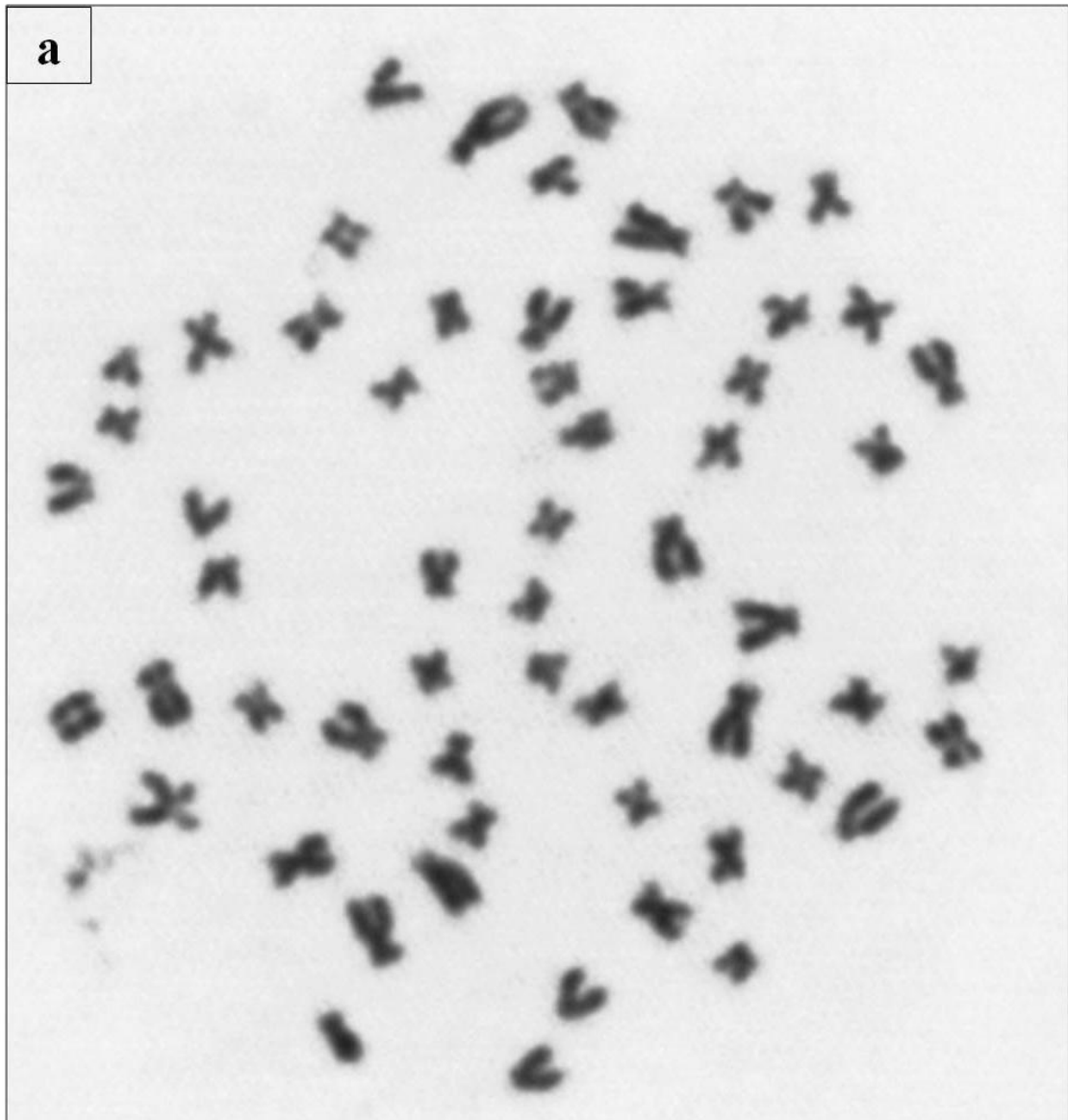
## **2.5 Análise Estatística**

Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com o pós-teste de Student-Newman-Keuls, considerando valor de  $p$  0,05 para comparar os grupos teste e controle.

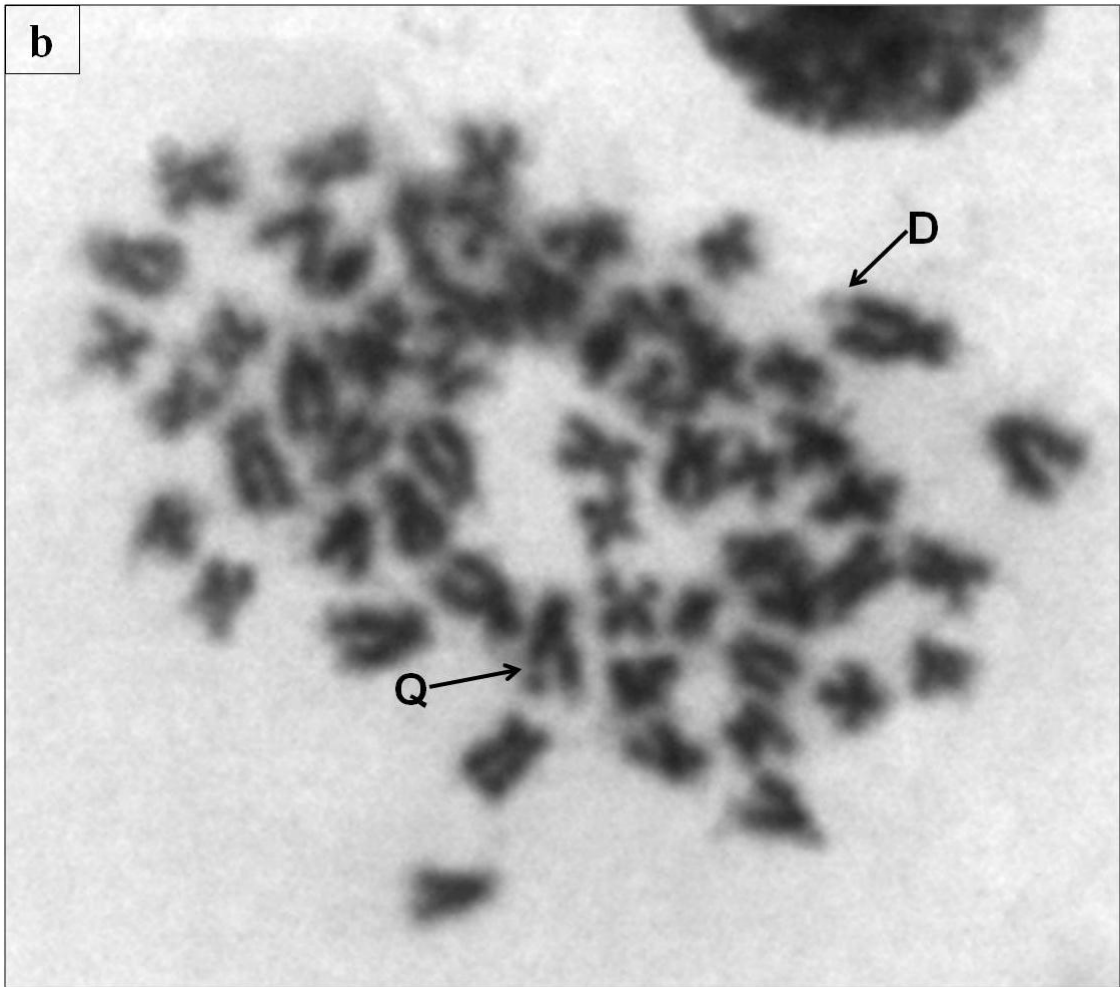
### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

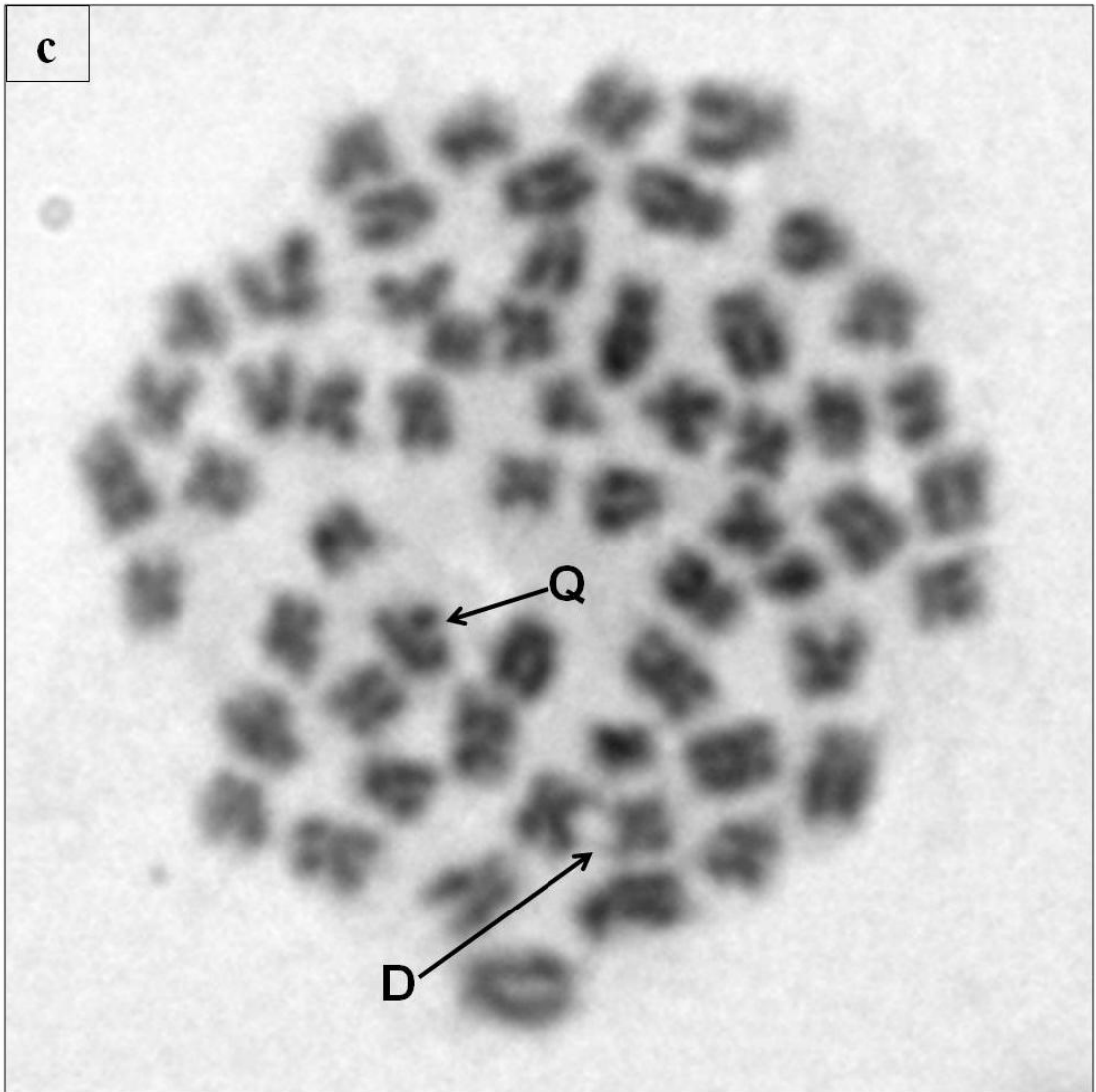
Analisou-se um total de 1966 metáfases e foram encontradas aberrações cromossômicas (AC) do tipo estruturais, caracterizadas como: quebras de cromátide (“Q”), descondensação da região telomérica (“D”) e separação precoce de cromátides irmãs (“S”) (Figura 3).

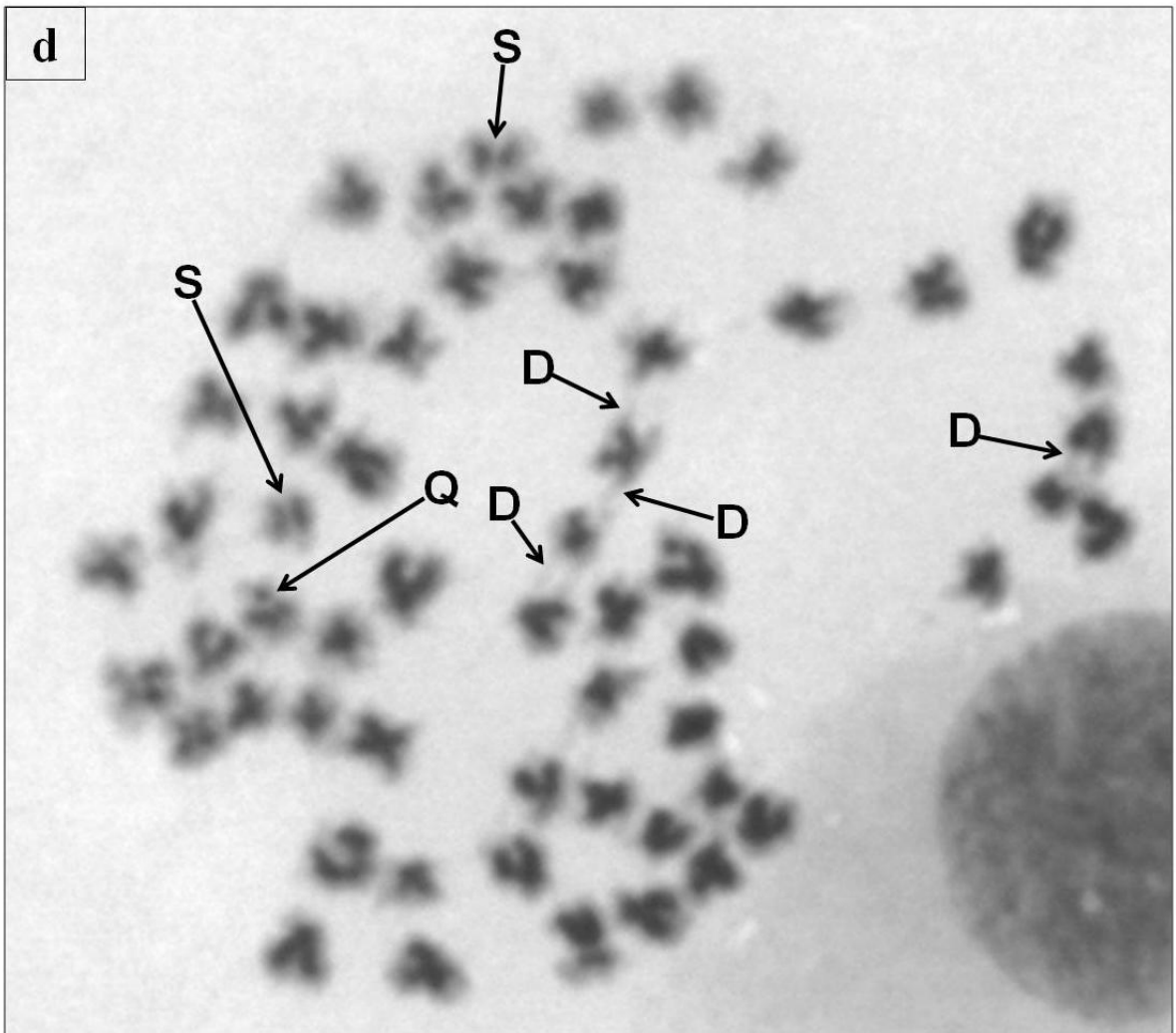
**FIGURA 3.** Cromossomos mitóticos de *Rhamdia quelen* ( $2N = 58$ ) submetida à contaminação com sulfato de alumínio. (a) Metáfase de exemplar do grupo controle negativo, sem aberrações cromossômicas. (b) Metáfase de exemplar submetido à concentração de 5mg/kg; (c) 50mg/kg e (d) 500mg/kg. A letra “Q” representa quebras na cromátide, “D” descondensações e “S” as separações de cromátides. Aumento em 2000X.







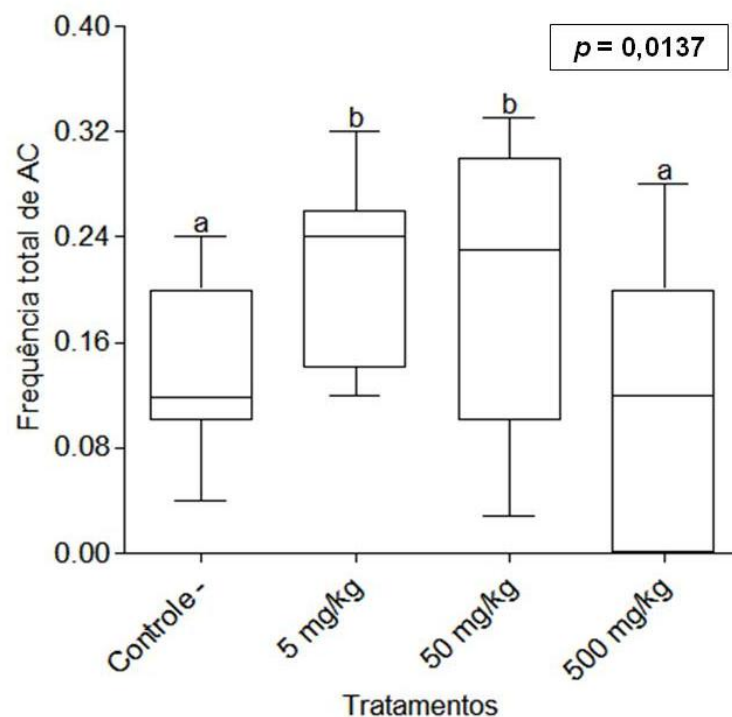




Através do teste de aberrações cromossômicas, foi possível observar o potencial genotóxico do sulfato de alumínio nas concentrações 5mg/kg e 50mg/kg. A frequência de aberrações cromossômicas (AC) totais nos grupos contaminados com 5mg/kg ( $p = 0,0154$ ) e 50mg/kg ( $p = 0,0245$ ) de sulfato de alumínio foi maior que a frequência encontrada no grupo controle negativo (Figura 4).

Foi encontrado um menor número de metáfases no grupo contaminado com 500mg/kg, prejudicando a análise de aberrações cromossômicas. Possivelmente a dose de 500mg/kg do contaminante provocou maior dano ao tecido, não sendo possível verificar diferença em relação ao controle negativo (Figura 4).

**FIGURA 4.** Comparação da frequência total de aberrações cromossômicas (AC) entre os tratamentos através do teste de Kruskal Wallis com pós-teste Student-Newman-Keuls. Letras iguais indicam que não há diferença entre os grupos, considerando valores de  $p < 0,05$ .

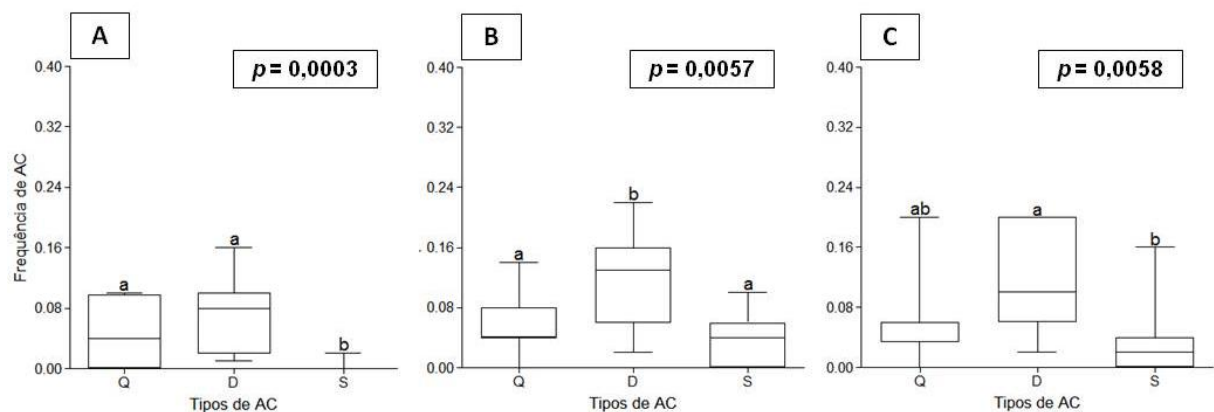


Considerando os tipos de aberrações cromossômicas que foram encontradas em cada tratamento, no grupo controle negativo houve diferença das frequências de quebras e descondensações, em relação à separação precoce de cromátides irmãs ( $p = 0,0055$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) (Figura 5A).

No grupo contaminado com 5mg/kg de sulfato de alumínio, a frequência de descondensações diferiu tanto da frequência de quebras quanto da frequência de separação de cromátides ( $p = 0,0206$  ;  $p = 0,0023$ ; respectivamente) (Figura 5B). O

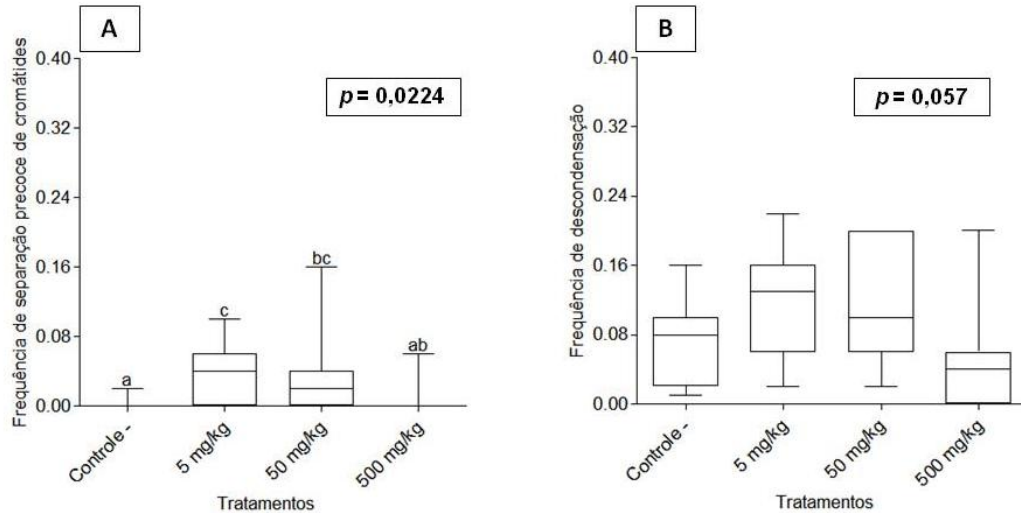
grupo contaminado com 50mg/kg apresentou diferença entre a frequência de descondensações e a frequência de separação de cromátides ( $p = 0,0014$ ) (Figura 5C). Não houve diferença entre os tipos de aberrações cromossômicas no grupo contaminado com 500mg/kg ( $p > 0,05$ ).

**FIGURA 5.** Comparação da frequência dos tipos de aberrações cromossômicas (AC). (A) Grupo controle negativo; (B) grupo contaminado com 5 mg/kg de sulfato de alumínio e (C) contaminado com 50 mg/kg. Quebras de cromátide (Q), descondensações (D) e separação precoce de cromátides irmãs (S). Teste de Kruskal Wallis com pós-teste Student-Newman-Keuls. Letras iguais indicam que não há diferença entre os grupos, considerando valores de  $p < 0,05$ .



A análise por tipo de aberração cromossômica indicou que somente a separação precoce de cromátides irmãs apresentou diferença entre os tratamentos de 5 mg/kg e 50 mg/kg de sulfato de alumínio em relação aos grupos controle negativo ( $p = 0,0099$ ;  $p = 0,0329$ ; respectivamente) (Figura 6A). Porém foi observada uma tendência dos grupos apresentarem diferença em relação à frequência de descondensações ( $p = 0,0570$ ), com os grupos 5 e 50 mg/kg tendo os maiores valores (Figura 6B).

**FIGURA 6.** (A) Comparação da frequência de separação precoce de cromátides entre os tratamentos através do teste de Kruskal Wallis com pós-teste Student-Newman-Keuls. Letras iguais indicam que não há diferença entre os grupos, considerando valores de  $P < 0,05$ . (B) Comparação da frequência de descondensações entre os tratamentos através do teste de Kruskal Wallis, considerando valores de  $p < 0,05$ .



Quebras cromossômicas e outras mutações cromossômicas foram encontradas em contaminações com alumínio. Patel *et al.* (2009) encontraram danos teloméricos na contaminação por alumínio e fluoretos em cultura de linfócitos humanos. Danos na região telomérica, causados por compostos tóxicos, levam a instabilidade cromossômica, resultando em morte celular.

O centrômero é uma região do cromossomo de heterocromatina compactada, sendo as histonas responsáveis pelo processo de compactação (HAGELE, 1977; MICHAILOVA *et al.*, 1997). Em *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) foi observada descondensação da região centromérica, quando submetidas à contaminação por alumínio, provavelmente devido à inibição da síntese de histonas (MICHAILOVA *et al.*, 2003).

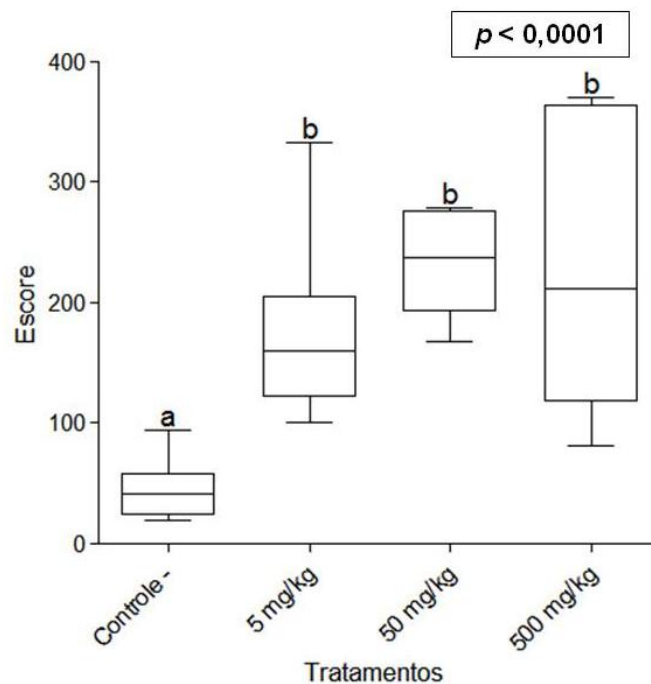
Além disso, há relatos de que o alumínio afeta a mobilidade dos cromossomos durante o processo de divisão celular (LUKIW & MCLACHLAN, 1995). Portanto, sugerimos neste trabalho, que a descondensação da região telomérica dos cromossomos pode ter ocorrido devido a modificações em estruturas de proteínas responsáveis pela compactação do DNA, podendo também ter promovido as quebras de cromátide. A separação precoce de cromátides-irmãs pode ter ocorrido devido à mudança de mobilidade dos cromossomos durante mitose.

Há evidências de que o alumínio induz aberrações cromossômicas, micronúcleos e troca de cromátides irmãs em linfócitos humanos (ROY *et al.*, 1989; MIGLIORE *et al.*, 1999; BANASIK *et al.*, 2005). A forma como o alumínio induz danos ao DNA não é conhecida, mas um mecanismo provável é a indução de danos oxidativos, sendo o alumínio responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (YOUSEF, 2004). Além disso, este composto influencia a expressão gênica, altera a fosforilação lipídica e inibe algumas enzimas celulares (LI *et al.*, 1998).

A dose de 500mg/kg de sulfato de alumínio pode ter causado maiores danos aos peixes, devido a prováveis eventos de morte celular, prejudicando a análise de aberrações cromossômicas. A fim de minimizar estes fatores, foi realizado o ensaio cometa, por sua maior sensibilidade na avaliação de quebras no DNA. Essa técnica é capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas, tanto quebras de fita simples quanto quebras de fita dupla (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; SAZAKI *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 1988). Lesões ao DNA são produzidas diretamente pelo xenobiótico ou durante o reparo por excisão de aductos de DNA (SPEIT & HARTMANN, 1995).

Com o ensaio cometa foi possível observar danos nas concentrações 5mg/kg, 50mg/kg e 500mg/kg, sendo que os grupos contaminados apresentaram diferença em relação ao grupo controle negativo ( $p = 0,001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente), apresentando elevados níveis de danos ao DNA, confirmando o efeito genotóxico do sulfato de alumínio. Porém não foi observada uma relação dose-resposta, pois não houve aumento dos danos no DNA com o aumento das doses (Figura 7). Em estudos de toxicidade do alumínio em leucócitos mononucleados, de pessoas que utilizavam diariamente utensílios de alumínio para cozinhar ou armazenar alimentos, foi detectado danos elevados ao DNA, sendo relacionado com a geração de estresse oxidativo (CELIK *et al.*, 2012). Utilizando o ensaio cometa para verificar o potencial genotóxico do alumínio em *Prochilodus lineatus*, contaminados por exposição hídrica aguda e subcrônica, Galindo *et al.* (2010) observaram aumento de danos no DNA após 6 e 96 horas de exposição, e após 24 horas e 15 dias, não houve diferença em relação ao controle negativo, sugerindo que houve reparo dos danos no DNA. Sendo assim, a utilização do ensaio cometa permitiu confirmar o potencial genotóxico do alumínio, porém, os danos detectados podem ser passíveis ao mecanismo de reparo do DNA.

**FIGURA 7.** Comparação de danos no DNA pelo ensaio cometa entre os tratamentos através do teste de Kruskal Wallis. Letras iguais indicam que não há diferença entre os grupos, considerando valores de  $P < 0,05$ .



Podemos confirmar que a espécie *Rhamdia quelen* pode ser considerada um bom bioindicador em testes de genotoxicidade, como já afirmado por Ferraro (2009). O peixe jundiá (*Rhamdia quelen*) foi utilizado em diversos estudos de genotoxicidade, com o fripronil, naftaleno e nitrato de chumbo por contaminação subcrônica (RAMSDORF, 2011). Ghisi *et al.*, em 2011, realizaram o teste de genotoxicidade após contaminação subcrônica do inseticida Fipronil em *Rhamdia quelen*. E, Pamplona *et al.* (2011), utilizou o *Rhamdia quelen* como bioindicador para verificar os efeitos genéticos e bioquímicos da administração subcrônica de dipirona.

Como conclusão, podemos afirmar que o sulfato de alumínio apresentou genotoxicidade em tecido renal de *Rhamdia quelen*. Tanto o teste de aberrações cromossômicas, quanto o ensaio cometa confirmaram o potencial genotóxico do alumínio, sendo que o ensaio cometa, por ser mais sensível, foi extremamente eficaz para mostrar os danos ao DNA. O teste de aberrações cromossômicas teve como importância detectar os efeitos clatogênicos ocasionados pela exposição ao sulfato de alumínio.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANASIK, A., LANKOFF, A., PISKULAK, A., ADAMOWSKA, K., LISOWSKA, H., WOJCIK, A. Aluminium-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. **Environ. Toxicol.** 20, 402–406, 2005.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K. & KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v.415, n.3, p.167-84, 1998

CELIK, H., CELIK, N., KOCYIGIT, A. & DIKILITAS, M. The relationship between plasma aluminum content, lymphocyte DNA damage, and oxidative status in persons using aluminum containers and utensils daily. **Clinical biochemistry**. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.08.010, 2012.

COLLINS A. R., DOBSON V. L., DUSINSKA M, KENNEDY G, STETINA R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research** 376:183–193, 1997.

COSTA, M., KRAKER, A. J., PATIERNO, S. R. Toxicity and carcinogenicity of essential and non-essential metals. In: FOREMAN, D. T. (Ed). **Progress in Clinical Biochemistry**, v. 1, Springer-Verlag, Berlin, p. 1-45, 1984.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEIL, K. L. The comet assay: A comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p 37-59, 1995.

FENOCCHIO, A S.; VENERE, P. C.; CESAR, A C. G.; DIAS, A L. AND BERTOLLO, L. A C. Short Term Culture From Solid Tissues of Fishes. **Caryologia**, 44,2: 161-166, 1991.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas**. Dissertation, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. Brasil, 2003.

FERRARO, M. V. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos.** Tese de doutorado, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, 2009.

FERRARO, M. V. M, FENOCCHIO, A. S., MANTOVANI, M. S., RIBEIRO, C. O., CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n. 1, p. 103-107, 2004.

GALINDO, B. A., TROILO, G., CÓLUS, I. M. S., MARTINEZ, C. B. R. & SOFIA, S. H. Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. **Water, Air, & Soil Pollution** 212, 419–428, 2010.

GANROT, R. Metabolism and Possible Health Effects of Aluminum. **Environmental Health Perspectives.**, v. 65, p. 363-441, 1986.

GARDNER, H.S., VAN DER SCHALIE, W.H., WOLFE, M.J., FINCH, R.A. New methods for on-site biological monitoring of effluent water quality. In: Sandhur, S.S., Lower, W.R., de Serres, F.J., Shuk, W.A., Tice, R.R. (Eds). **In Situ Evaluations of Biological Hazards of environmental Pollutants.** New York:Plenum; p.61–69,1990.

GHISI N. C, RAMSDORF WA, FERRARO MV, DE ALMEIDA MI, RIBEIRO CA, CESTARI MM. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environ Monit Assess.** 180(1-4):589-99. 2011.

GONTIJO, Á.M.M.C., BARRETO, R.E., SPEIT, G., REYES, V.A.V., VOLPATO, G.L., SALVADORI, D.M.F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutag.** 534, p. 165-172, 2003.

GUTHRIE, F. E., PERRY, J.J. **Introduction to Environmental Toxicology**, Elsevier, N. Y., 484, 1980.

HAGELE, K. Differential staining of polytene chromosome bands in *Chironomus* by Giemsa banding methods. **Chromosoma** 59, 207– 216, 1977.

HAMOND, P. B. , BELILES, R. P. Casarett and Doull's Toxicology, **The Basic Science of Poisons**, R. Doull et al (eds), Macmillan, N. Y, 406-467, 1980.

KAZANTZIS, G., LILLY, L. J. Mutagenic and carcinogenic effects of metals. In: FRIBERG, L., NORDBERG, F., VOUK, V. (Eds). **Handbook on the Toxicology of Metals**, 2a ed., v. 2, Elsevier, Amsterdam, pp. 319-390, 1986.

KENDALL, R. J.; ANDERSON, T. A.; BAKER, R. J.; BENS, C. M.; CARR, J. A.; CHIODO, L. A.; COBB III, G. P.; DICKERSON, R. L.; DIXON, K. R.; FRAME, L. T.; HOOPER, M. J.; MARTIN, C. F.; McMURRY, S. T.; PATINO, R.; SMITH, E. E.; THEODORAKIS, C. W. **Ecotoxicology. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6. ed., KLAASSEN, C. D. (Ed.). McGraw-Hill, 1236p., 2001.

KOIVISTOINEN, P (Ed.). Mineral element composition of Finnish foods: N, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, Ni, Cr, F, Se, Si, Rb, Al, B, Br, Hg, As, Cd, Pb, and ash. **Acta Agr. Scand.** (Suppl.), v. 22, p.1-171, 1980.

LANKOFF, A., BANASIK, A; DUMA, A.; OCHNIAK, E.; LISOWSKA, H.; KUSZEWSKI, T.; GÓŹDŹ, S.; WOJCIK, A. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology Letters** 161, 27–36, 2006.

LI, W., MA, K.K., SUN, W., PAUDEL, H.K. Phosphorylation sensitizes microtubule-associated protein tau to Al<sup>(3+)</sup>-induced aggregation. **Neurochem. Res.** 23, 1467–1476, 1998.

LIONE, A. The prophylactic reduction of aluminium intake. **Food Chem. Toxicol.**, v. 21, p. 103-109, 1983.

LUKIW, W.J., MCLACHLAN, D.R.C., 1995. Neurotoxicity of aluminium. In: Chang, L., Dyer, R. (Eds.), **Handbook of Neurotoxicity II: Effects and Mechanisms**. Marcel Dekker, New York, pp. 105–142.

METCALFE, C.D. Tests for predicting carcinogenicity in fish. **CRC Rev Aquat Sci.** v. 1, p.111–129, 1989.

MICHAILOVA, P., ILKOVA, J. & WHITE, K. N. Functional and structural rearrangements of salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) in response to freshly neutralized aluminium. **Environmental pollution** (Barking, Essex : 1987) 123, 193–207 (2003).

MICHAILOVA, P., RAMELLA, L., SELLA, G., BOVERO, S. C band variation in polytene chromosomes of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from a polluted Piedmont station (Italy). **Cytobios** 90, 139–151, 1997.

MIGLIORE, L., COCCHI, L., NESTI, C., SABBIONI, E. Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. **Environ. Mol. Mutagen.** 34, 279–284, 1999.

NAYAK, P. Aluminum: impacts and disease. **Environ. Res.** 89,101–115, 2002.

NORSETH, T. **Metal carcinogenesis**. Ann. N.Y. Acad. Sci., p. 377-386, 1988.

OBE, G. *et al.* Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation research** 504, 17–36, 2002.

PALITTI, F. Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. **Mutation Research** 404, 133–137, 1998.

PAMPLONA J.H, DA SILVA T.A., RAMOS L.P., RAMSDORF, W.A., CESTARI M.M., OLIVEIRA RIBEIRO C.A. . ZAMPRONIO A.R, SILVA DE ASSIS H.C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 74: 342–349, 2011.

PATEL, T. N. *et al.* Genotoxic potential of aluminum and fluoride on human peripheral blood lymphocytes. **Res. Environ. Life Sci.** 2(3), 147–152, 2009.

POWERS, D.A. Fish as model systems. **Science.**, v. 246, p.352–358, 1989.

PROVOST, G. S.; KRETZ, P. I.; HAMMER, R. T.; MATTHEWS, C. D.; ROGERS, B. J.; LUNDBERG, K. S.; DYCAICO, M. J.; SHORT, J. M. Transgenic Systems for in vivo mutation analyses. **Mutation research**, v. 288, p 133-149, 1993.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A; COSTA, J. R. M; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environ Monit Assess.** 158(1-4):77-85, 2009.

RAMSDORF, W.; CESTARI, M.M.; ASSIS, H. C. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes.** Tese de doutorado, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, 2011.

Roy, A. K., Talukder, G. & Sharma, A. Effects of aluminium sulphate on human leukocyte chromosomes in vitro. **Mutation research** 244, 179–83, 1990.

SAZAKI, Y. F.; FUJIKAWA, K.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, N., NISHIKAWA, Y.; OHTA, S.; SATOH, M.; MARADAME, H.; UENO, S.; SUSAN, N.; MATSUSAKA, N.; TSUDA, S. The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: results with 30 aromatic amines. **Mutation Research**, v 440, p 1-18, 1999.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experience Cell Research**, v 175, p 184-191, 1988.

SINGH, N. P.; STEPHENS, R. E. Microgel electroforesis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. **Mutation Research**, v 383, p 167-175, 1997.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, v 10, p 555-559, 1995.

TWERDOK, L.E., BURTON, D.T., GARDNER, H.S., SHEDD, T.R., WOLFE, M.J. The use of nontraditional assays in an integrated environmental assessment of contaminated ground U.S. Environmental Protection Agency. National primary and secondary ambient air quality standards: notice of proposed standards for sulfur oxides, particulate matter, carbon monoxide, photochemical oxidants, hydrocarbons, and nitrogen oxides. **Fed. Reg.** 36, p.1502-1514, 1971.

WALKER, W.W., MANNING, C.S., OVERSTREET, R.M., HAWKINS, W.E. Development of aquarium fish models for environmental carcinogenesis: an intermittent flow exposure system for volatile, hydrophobic chemicals. **J Appl Toxicol.**, v.5, p.255–260, 1985.

WOO, Y.-T., LAI, D. J., ARCOS, J. C., ARGUS, M. F. Chemical Induction of Cancer, Structural Bases and Biological Mechanisms. Academic Press, San Diego, CA, 1988.

YOUSEF, M.I. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. **Toxicology** 199, 47–57, 2004.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (eds). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** Ed Rima, São Carlos-SP, 2006.

## ANEXOS

### **Protocolo para o teste de aberrações cromossômicas em *Rhamdia quelen***

#### *Processamento do material*

Utilizou-se o método indireto de cultura de tecidos sólidos segundo FENOCCHIO et al. (1991), com modificações.

- a) Retirou-se várias porções posterior do rim e transferiu-se para placas de Petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI mais 20% de soro bovino fetal.
- b) O material foi desagregado com pinças de ponta fina com posterior aspiração e expiração da suspensão com uma seringa de vidro sem agulha.
- c) A solução de células obtida foi incubada em estufa a 29°C de 6 a 8 horas em média.
- d) Faltando 45 minutos para completar o tempo, foi adicionada 34µL de colchicina (0,025%) em cada recipiente. As placas de Petri foram gentilmente agitadas para homogeneizar o material e estas foram mantidas na estufa até o tempo final.
- e) Passando este tempo, a cultura foi transferida para um tubo de ensaio e será centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- f) O sobrenadante foi descartado e o tubo completado até 8 ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). A solução foi ressuspensa por cerca de 50 vezes e em seguida permaneceu estufa a 37°C por 45 minutos.
- g) O fixador foi preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e mantido sob refrigeração. Dado o tempo da hipotonização, foram pingadas algumas gotas de fixador em cada tubo. O material foi ressuspensa até ficar homogêneo, e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- h) O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 2 ml de fixador. O material foi ressuspensa de forma que a solução se tornou homogênea e em seguida o tubo foi completado até o volume de 8 ml com fixador. Novamente o material foi ressuspensa e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- i) A etapa anterior foi repetida por mais duas vezes.

j) Descartado o sobrenadante, foi colocado 1,5 ml de fixador e o material ressuspenso. Esta suspensão foi armazenada em tubo de micropipeta do tipo Eppendorf em freezer à -20°C.

#### *Análise dos cariótipos*

O material após ser retirado do freezer (-20°C) foi gotejado (2 a 3 gotas) sobre uma lâmina úmida pré-aquecida à 54°C.

A coloração seguiu a técnica tradicional, com o uso de solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,8). Esta será colocada sobre as lâminas e deixada por um período de 10 minutos. Transcorrido o tempo foram lavadas e deixadas secar ao ar.

As lâminas são analisadas em microscópio óptico, buscando metáfases no aumento de 200X, e quando encontradas analisa-se em aumento de 1000X. Observa-se a quantidade de cromossomos e alterações estruturais.



## **Protocolo para o ensaio cometa**

A técnica foi descrita por Speit e Hartmann (1999), com alterações segundo Ferraro (2003).

### *Preparação das lâminas com cobertura de agarose*

- a) Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi levada ao forno de microondas até sua fervura e completa dissolução.
- b) Após fervura, a agarose foi deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta foi picada e levada novamente ao forno de microondas. Essa etapa foi repetida pelo menos três vezes. Ao final desse processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.
- c) As lâminas, previamente limpas, foram então mergulhadas na agarose aquecida, sendo o lado da lamina contendo a porção não esmerilhada limpo com um lenço de papel e álcool.
- d) As lâminas foram deixadas para secar overnight em superfície plana e a temperatura ambiente, para solidificação da cobertura de agarose.

### *Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)*

- a) Foram dissolvidos 100 mg de agarose normal em 20 ml de PBS.
- b) Essa solução foi levada para fervura em forno de microondas somente uma vez.
- c) A agarose LMP foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando foi então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

### *Procedimento para montagem e análise das lâminas de ensaio cometa com células do rim:*

- a) Coletar uma porção do rim de cada animal e misturar com 1 ml de soro bovino fetal; Desta solução, coletar 40 µl de suspensão celular e misturar com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C);

- b) Colocar sobre uma lâmina com a cobertura de agarose normal;
- c) Cobrir a lâmina com uma lamínula e levar a geladeira por 15 minutos;
- d) Depois de decorrido o tempo de refrigeração, retirar as lamínulas com cuidado;
- e) Colocar as lâminas em solução de lise dentro de cubetas e manter em refrigerador por 24 horas;
- f) Preparar a cuba de eletroforese mergulhando-a em gelo (4°C) e no escuro;
- g) Colocar as lâminas na cuba horizontal de eletroforese, quando necessário, preencher os espaços vazios com lâminas limpas;
- h) Na cuba de eletroforese, adicionar suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas;
- i) Manter as lâminas na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA;
- j) Iniciar a corrida de eletroforese a 25V e 300 mA por 25 minutos;
- k) Terminada a eletroforese, retirar as lâminas cuidadosamente e neutralizar com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos;
- l) Repetir a neutralização por mais duas vezes;
- m) Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol por 5 minutos;
- n) Para a coloração, adicionar 20 µL de brometo de etídeo (20 mg. L<sup>-1</sup>) em cada lâmina, cobrir com lamínula e analisar imediatamente.

### *Escores*

Analisar sob microscópio de epifluorescência com aumento de 400x em teste cego, 100 cometas em cada lâmina.

Classificar os cometas de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida de eletroforese, sendo: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano moderado), 3 (dano elevado) e 4 (dano máximo). Os cometas em que não é possível visualizar a região da cabeça devem ser desconsiderados da contagem por representarem DNAs totalmente fragmentados, característicos de células inviáveis.

Atribuir escores de danos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

$$\text{Escores} = \{(0 \times \text{dano } 0) + (1 \times \text{dano } 1) + (2 \times \text{dano } 2) + (3 \times \text{dano } 3) + (4 \times \text{dano } 4)\}$$