



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE SULFATO DE ALUMÍNIO E  
SULFATO DE COBRE EM BIOENSAIO DE CONTAMINAÇÃO  
SUBCRÔNICA VIA TRÓFICA NO BIOINDICADOR *Rhamdia quelen*  
(SILURIFORME).

Paula Moiana da Costa

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

Curitiba, PR  
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE SULFATO DE ALUMÍNIO E  
SULFATO DE COBRE EM BIOENSAIO DE CONTAMINAÇÃO  
SUBCRÔNICA VIA TRÓFICA NO BIOINDICADOR *Rhamdia quelen*  
(SILURIFORME).

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Ciências Biológicas, área de  
concentração em Genética, pela Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marta Margarete Cestari  
Co-Orientadores: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari  
Prof. Dr. Marcos Vinícius M. Ferraro

Paula Moiana da Costa

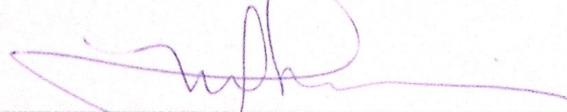
Curitiba, PR  
2011

## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado a qual se submeteu **PAULA MOIANA DA COSTA**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

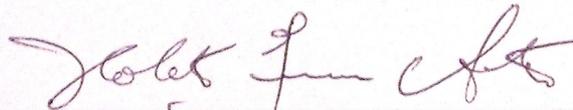
Curitiba, 12 de dezembro de 2011



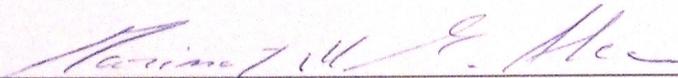
**Professora Doutora Maria Aparecida Marin Morales**  
UNESP – Membro Titular



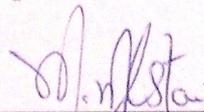
**Professora Doutora Helena Cristina da Silva de Assis**  
Depto Farmacologia/UFPR – Membro Titular



**Professor Doutor Roberto Ferreira Artoni**  
UEPG – Membro Titular



**Professora Doutora Marina Isabel Mateus de Almeida**  
Depto Genética/UFPR – Membro Titular



**Professora Doutora Marta Margarete Cestari**  
UFPR – Orientadora e Presidente da banca

Visto



**Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Coordenador do Programa de Pós Graduação em Genética

## Agradecimentos

À Profª. Drª. Marta Margarete Cestari, meu maior agradecimento. Obrigada por estes anos de convivência, pelos ensinamentos, pelo apoio e paciência, e por tudo o mais que vai além do que eu poderia descrever nesta página;

Ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, obrigada pela persistência, paciência e sugestões tão essenciais para a realização deste trabalho, e por tão simpaticamente me receber na UEPG;

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius M. Ferraro, por todos os ensinamentos e sugestões;

Aos membros da banca, pela presença e sugestões;

À Profª. Drª. Helena Cristina da Silva de Assis e ao Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade, pelas contribuições com este trabalho;

À Profª. Drª. Marina Isabel Mateus de Almeida e Prof. Dr. Roberto Artoni, pelas importantes sugestões como membros da comissão de acompanhamento;

Ao prof. Dr. Ives José Sbalqueiro, Drª. Iris Hass e Drª. Chirley Glienke, pela avaliação da qualificação, e pela agradável amizade;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética da UFPR, que contribuíram tanto com a minha formação;

Aos funcionários do Centro Politécnico da UFR, sem os quais nada funcionaria;

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese, pela agradável convivência e pela mãozinha essencial em tantas ocasiões;

À Emanuele Cristina Pesenti, minha companheira de aventuras, por toda a ajuda, apoio, conversas e risadas;

Ao Diego, por estar sempre do meu lado e acreditar tanto em mim;

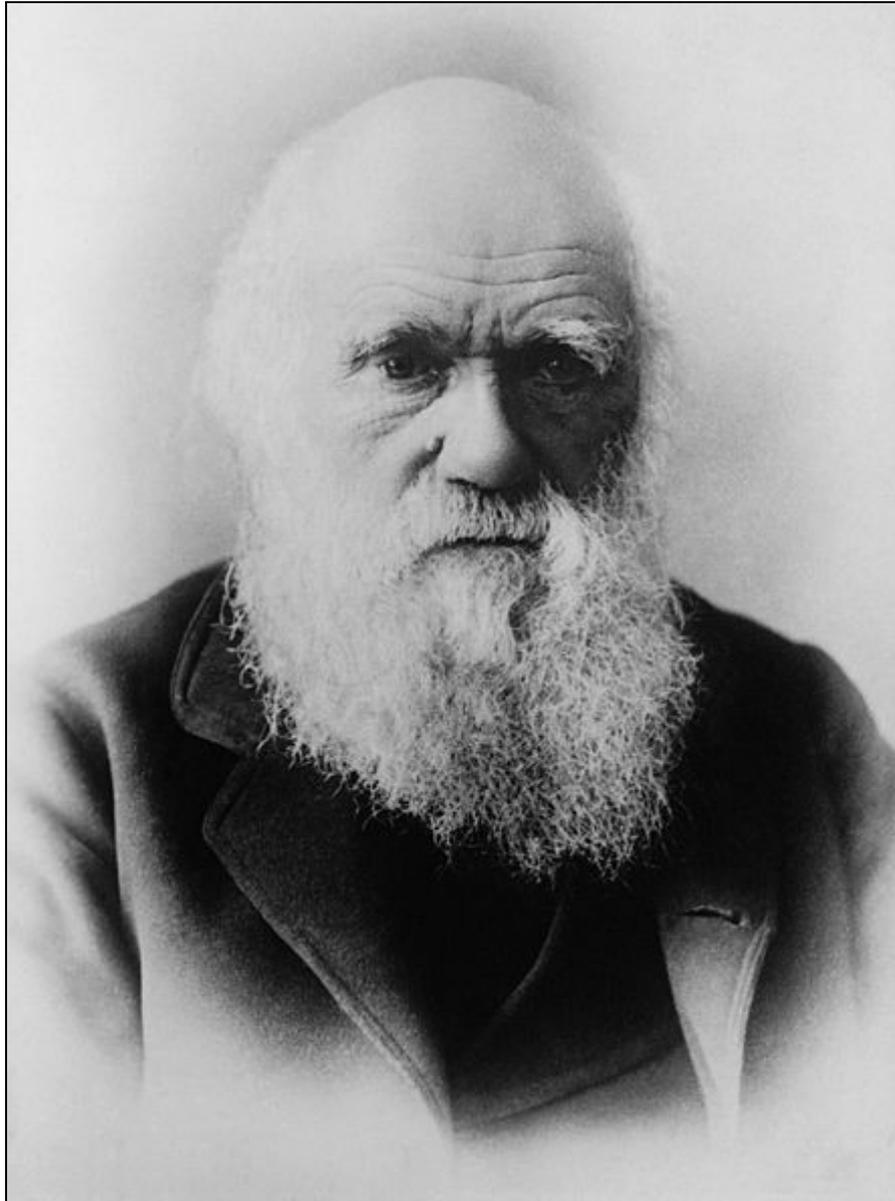
À minha família, que me suporta em todos os momentos, e sem a qual eu jamais teria saído do lugar;

Às minhas irmãs Renata e Raphaela, que foram tias da Sophia no momento em que eu mais precisei. Sem vocês, nunca teria concluído esta tese.

À minha filhinha, Sophia, que trouxe uma nova razão para todas as coisas;

Ao PPGen, pelo suporte e oportunidades oferecidas;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado.



*“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”*

Charles Darwin



*Para Sophia.* 

## SUMÁRIO

Lista de Figuras -----	vi
Lista de Tabelas -----	viii
Resumo Geral -----	ix
<b>I- INTRODUÇÃO-----</b>	<b>01</b>
<b>1– Contaminação Ambiental-----</b>	<b>01</b>
<b>2 – Metais-----</b>	<b>02</b>
2.1 – Cobre-----	07
2.2 – Alumínio-----	09
<b>3– Genotoxicidade -----</b>	<b>13</b>
3.1 – Testes em Genética Toxicológica-----	15
<b>4 – Peixes -----</b>	<b>24</b>
4.1 – <i>Rhamdia quelen</i> -----	25
<b>II – OBJETIVOS-----</b>	<b>27</b>
<b>III – MATERIAIS E MÉTODOS-----</b>	<b>28</b>
1 – Contaminação dos Animais-----	28
2 – Obtenção do Material -----	28
3 – Teste de Micronúcleos -----	29
4 – Ensaio Cometa -----	29
5 – Hibridização <i>Fluorescente in situ</i> (FISH) em Cometa -----	30
<b>Capítulo I-----</b>	<b>33</b>
Resumo -----	34
1- Introdução-----	35
2 – Materiais e Métodos -----	36
3- Resultados -----	37
4 - Discussão -----	41
5 - Conclusão -----	44
6 – Referências Bibliográficas -----	44
7 – Apêndices -----	45

<b>Capítulo II</b> -----	51
Resumo -----	52
1- Introdução-----	53
2 – Materiais e Métodos -----	56
3 - Resultados -----	58
4 - Discussão -----	60
5 - Conclusão -----	62
6 – Referências Bibliográficas -----	62
7 – Apêndices -----	63
<b>Capítulo III</b> -----	69
Resumo -----	70
1- Introdução-----	71
2 –Materiais-----	74
3 –Procedimentos-----	77
4 - Resultados Esperados-----	80
5 – Referências Bibliográficas -----	81
6 – Informações Complementares -----	81
7- Anexos-----	82
<b>IV – RESULTADOS ADICIONAIS</b> -----	85
<b>V – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> -----	86
<b>VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	89
<b>VII – ANEXOS</b> -----	114

## Lista de Figuras

### Capítulo I

Figura 1: Comparação entre os danos observados no Ensaio Cometa referentes aos tecidos sanguíneo (A), hepático (B), renal (C) e cerebral (D) nas doses de 5, 30 e 50 mg/Kg de Sulfato de Cobre e controles. As letras (a, b, c) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ ..... 43

Figura 2: Comparação entre os danos observados no Ensaio Cometa referentes às doses de 5 mg/kg (A), 30 mg/kg (B) e 50 mg/Kg (C) de Sulfato de Cobre e controles com ração comercial padrão (D) e preparado com ração comercial padrão e gelatina (E). As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ ..... 44

Figura 3: Comparação entre micronúcleos e combinações de lesões nucleares referentes às doses de 5 mg/kg (A), 30 mg/kg (B) e 50 mg/Kg (C) de Sulfato de Cobre, e alterações totais (D). As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . ..... 43

Figura 4: Frequência de Eritrócitos Policromáticos (EPC) relativos aos eritrócitos totais referentes às doses de 5, 30 e 50 mg/Kg de Sulfato de Cobre e controles negativos CRC e CRG. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . ..... 43

Figura 5: Percentagem de células sanguíneas viáveis como resultado da citometria de fluxo com 7-AAD..... 43

### Capítulo II

Figura 1: Comparação entre os danos observados no Ensaio Cometa referentes aos tecidos sanguíneo (A), hepático (B), renal (C) e cerebral (D) nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg de Sulfato

de Alumínio e controles. As letras (a, b, c) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ ..... 43

Figura 2: Comparação entre os danos observados no Ensaio Cometa referentes às doses de 5 mg/kg (A), 50 mg/kg (B) e 500 mg/Kg (C) de Sulfato de Alumínio e controles com ração comercial padrão (D) e preparado com ração comercial padrão e gelatina (E). As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ ..... 44

Figura 3: Comparação entre micronúcleos e combinações de lesões nucleares referentes às doses de 5 mg/kg (A), 50 mg/kg (B) e 500 mg/Kg (C) de Sulfato de Alumínio, e alterações totais (D). As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . ..... 43

Figura 4: Frequência de Eritrócitos Policromáticos (EPC) relativos aos eritrócitos totais referentes às doses de 5, 50 e 500 mg/Kg de Sulfato de Alumínio e controles negativos CRC e CRG. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . ..... 43

Figura 5: Percentagem de células sanguíneas viáveis como resultado da citometria de fluxo com 7-AAD..... 43

### **Capítulo III**

Figura 1: Hibridização de sonda telomérica marcada com digoxigenina em cometas de células renais de *Rhamdia quelen* coradas com DAPI, após contaminação subcrônica por 60 dias com sulfato de cobre na dose de 50mg/Kg.....

## **Lista de Tabelas**

### **Capítulo I**

Tabela 1: Frequência observada de combinações de lesões nucleares em relação ao total de alterações, e prevalência de alterações totais em relação ao número total de células analisadas. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas entre as doses dentro de cada combinação. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . ..... 43

Tabela 2: Frequência observada de micronúcleos e lesões nucleares em relação ao total de alterações. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas entre as doses dentro de cada tipo de lesão. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . ..... 44

### **Capítulo II**

Tabela 1: Frequência observada de combinações de lesões nucleares em relação ao total de alterações, e prevalência de alterações totais em relação ao número total de células analisadas. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas entre as doses dentro de cada combinação. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . ..... 43

Tabela 2: Frequência observada de micronúcleos e lesões nucleares em relação ao total de alterações. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas entre as doses dentro de cada tipo de lesão. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . ..... 44

## **Resumo Geral**

O cobre é um elemento essencial para a atividade de diversas enzimas biológicas, mas em doses altas é considerado altamente tóxico às algas, fungos, sementes de plantas e invertebrados, e moderadamente tóxico aos mamíferos. Relata-se, especialmente, sua toxicidade a invertebrados marinhos e de água doce. O alumínio está presente em pequenas quantidades nos organismos vivos, mas é abundante no ambiente. Entretanto, estudos mostram que o aumento do alumínio dissolvido na água causa danos nas brânquias e mortes de peixes, e a cromatina é apontada como sendo a estrutura celular mais vulnerável. O objetivo do presente trabalho é verificar a genotoxicidade do Sulfato de Cobre e do Sulfato de Alumínio no bioindicador *Rhamdia quelen* em contaminação subcrônica via trófica, além de adaptar a técnica comet-FISH para esta espécie. Para tal, os peixes foram separados em grupos e tratados durante 60 dias, perfazendo um total de 20 doses, com 5 mg/kg, 30 mg/Kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg de Sulfato de Cobre, ou 5 mg/kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg de Sulfato de Alumínio inserido em ração preparada com gelatina comercial sem sabor. Os tecidos sanguíneo, hepático, renal e cerebral foram submetidos ao Ensaio Cometa alcalino, Teste de Micronúcleos Píscios e Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo. Os resultados foram analisados através do teste de Kruskal - Wallis, e demonstraram que ambos os tratamentos induziram quebras no DNA deflagradas pelo ensaio cometa nos tecidos cerebral, sanguíneo, renal e hepático, sendo o cérebro o tecido mais sensível ao contaminante e o sangue o mais resistente. O tecido hepático se mostrou mais sensível a mudanças de concentração do sulfato de cobre. O teste de micronúcleos píscios com este contaminante não demonstrou alterações significativas em relação ao controle negativo. O Sulfato de Alumínio, no entanto, obteve resultados positivos a partir da dose de 50 mg/Kg. A frequência de eritrócitos policromáticos em relação ao número de eritrócitos totais não foi significativamente alterada em nenhum dos tratamentos, assim como a frequência de células inviáveis no tecido sanguíneo. O grupo com tratamento na dose de 500 mg/Kg do Sulfato de Cobre teve uma mortalidade de 81.25% durante os 60 dias de contaminação. O Ensaio Cometa fornece informações apenas ao nível de dano geral ao DNA. Assim, sua combinação com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) pode ser uma ferramenta interessante por permitir a alocação da sequência examinada na região danificada ou intacta do cometa, fornecendo informações adicionais sobre sequências ou regiões específicas do genoma. Desde seu desenvolvimento inicial, o Cometa-FISH tem sido usado para tratar de diferentes questões. Embora seja uma ferramenta promissora dentro da ecotoxicologia, não

foram ainda desenvolvidos trabalhos neste campo, tampouco utilizando peixes como modelo biológico. Portanto, a presente proposta consiste em adaptar e aplicar a técnica de Cometa – FISH nos nucleóides de células de jundiás.

# I - INTRODUÇÃO

## 1 – Contaminação Ambiental

À medida que a humanidade aumenta sua capacidade tecnológica de intervir na natureza, surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente. Como consequência da industrialização, houve a disponibilização de uma grande diversidade de produtos químicos potencialmente tóxicos e a geração de resíduos em quantidade significativamente prejudicial ao ambiente (ZAGATTO, 2006).

Apesar da comunidade científica muito já ter aprendido sobre as causas e consequências deletérias da descarga de contaminantes e nutrientes sobre os sistemas aquáticos, assiste-se, com o passar dos anos, a uma contínua degradação da qualidade e até à morte dos mesmos (ESTEVES & BARBOSA, 1986). A atividade agrícola em bacias hidrográficas continua aumentando, resultando na dispersão de fertilizantes (nitratos, fosfatos, etc), e o montante de nutrientes inorgânicos introduz produtos tóxicos (herbicidas, inseticidas, fungicidas) para várias espécies nos ambientes aquáticos (KELLY & HARWELL, 1989).

Embora o processo de eutrofização deste ambiente seja devido, na maioria dos casos, ao lançamento de efluentes urbanos e industriais, bem como por atividades agroindustriais, esse processo pode também ser natural, decorrente do carreamento de nutrientes originados na lixiviação dos solos das bacias hidrográficas pelas águas das chuvas (ESTEVES & BARBOSA, 1986).

Entretanto, devido, principalmente, às ocorrências de acidentes com produtos químicos, o interesse do homem pelas questões ambientais vem aumentando gradativamente. Devido a esses acontecimentos, vários países deram início ao monitoramento ambiental e a pesquisas para avaliação do nível de contaminação, principalmente de metais e orgânicos em efluentes de vários ramos industriais e de fungicidas utilizados em lavouras. Paralelamente à identificação dos agentes tóxicos e suas fontes de poluição, foram estabelecidos critérios e padrões que permitiram a disposição desses agentes em níveis compatíveis à manutenção da qualidade dos recursos hídricos estabelecidos com ênfase na potabilidade (ZAGATTO, 2006). Em todo o mundo, os efeitos da má qualidade da água são o segundo motivo, após a desnutrição, de doenças e causa de morte dos seres humanos. (MURRAY & LOPEZ, 1996).

Além disso, o aumento da contaminação ambiental também leva à progressiva deterioração da qualidade ambiental (BONAVENTURAL & JOHNSON, 1997), mas, até a década de 70,

apenas os critérios norte-americanos e soviéticos fizeram alusão a esse aspecto (BERTOLETTI *et al*, 1989; WHO, 1967). A partir de então, foram desenvolvidas diversas pesquisas com ênfase na escolha de organismos sensíveis e representativos do ambiente aquático e no cultivo de organismos em escala laboratorial, baseando-se nos critérios de qualidade das águas para proteção da vida aquática (ZAGATTO, 2006).

Associou-se, então, a toxicologia aquática e a humana, principalmente quanto ao potencial acumulativo de poluentes nos organismos que servem de alimento ao homem. Devido a sua particular importância para a saúde humana, essa área da ecotoxicologia desenvolveu-se rapidamente, sendo os estudos direcionados principalmente para a degradação, bioacumulação e toxicidade das substâncias químicas (ZAGATTO, 2006).

Duas classes de poluentes são de enorme importância prática e econômica. Uma delas consiste nos resíduos de materiais radioativos. A outra trata-se da categoria dos poluentes inorgânicos dos metais. Estes elementos naturais, encontrados na crosta terrestre, são utilizados em muitos processos industriais, um uso que tem resultado em sua liberação em altas concentrações e em formas mais acessíveis do que é típico em sistemas naturais (BONAVENTURAL & JOHNSON, 1997).

As indústrias de fabricação de aço, fundições, construção e lançamento de barcos, ferros-velhos, extração de minerais, minas, zonas de aterros, curtumes, fábricas de pneus e instalações militares são exemplos de setores responsáveis pela contaminação ambiental com metais (DD 175/1988).

## **2 - Metais**

Metais são componentes naturais do ambiente, e estão presentes em quantidades variáveis na geosfera, atmosfera, hidrosfera e biosfera. Plantas, animais e humanos dependem de alguns metais (ex: cobre, ferro e zinco) como micronutrientes, enquanto outros metais (ex: cádmio, chumbo e mercúrio) podem ser tóxicos mesmo em quantidades relativamente pequenas. Metais são originários de recursos geológicos naturais e sua liberação no ambiente pode ser acelerado por nossa sociedade moderna, incluindo mineração e processamento mineral, queima de combustíveis fósseis, e vida urbana. Atividades humanas alteraram drasticamente o balanço natural e o ciclo de metais em muitos locais, resultando na contaminação ambiental e sério impacto no ecossistema e na saúde humana (B. I. O., 2003; ESTEVES, 1988; KRUUS *et al*, 1991).

Metais constituem uma importante classe de poluentes, e derivam tanto de fontes pontuais, como efluentes industriais e rejeitos de mineração, como de recursos difusos, como enxurradas (ZIELHUIS, 1984). A toxicidade de um dado metal depende da espécie e propriedades químicas, assim como fatores ambientais como adsorção em superfícies sólidas, complexação e precipitação (ANWAR, 1997; BERNARD & LAUWERYS, 1989; CIESIELSKI *et al*, 1994; LAHDETIE, 1995; NORPPA *et al*, 1995). Esta toxicidade interfere em importantes processos, incluindo degradação aeróbia e anaeróbia de matéria orgânica (AVERY, HOWLET & RADICE, 1996; ROSIN, 1992; WOLFE, DURHAM & ARMSTRONG, 1970).

A especiação de metais nos ecossistemas aquáticos compreende a distribuição de várias formas físico-químicas nos compartimentos (coluna d'água e seus particulados suspensos, sedimentos e água intersticial). Os metais podem estar presentes nas seguintes formas: Livre e dissolvida; complexada pela matéria orgânica dissolvida; complexos solúveis, na fração de lipídios presentes na água; adsorvidos nas partículas coloidais e nos particulados orgânicos e inorgânicos suspensos na água; e insolubilizada, usualmente como sulfetos e carbonatos (ZAGATTO & MOZETO, 2006).

A existência dessa miríade torna, em termos práticos, impossível a discriminação de espécies individuais pelas metodologias usualmente empregadas (BATLEY, 1989), sendo possível apenas a identificação de grupos com propriedades físicas, químicas e biológicas similares, o que já constitui um ponto útil na identificação e quantificação dos efeitos deletérios dessas espécies aos diferentes representantes da biota (ZAGATTO & MOZETO, 2006).

Vários fatores abióticos limitam a motilidade físico-química de metais. Metais são imobilizados, por exemplo, pela precipitação como fosfato, carbonato, ou sais sulfídicos, e são menos disponibilizados para a biota (BABICH & STOTZKY, 1983).

Para que um composto se bioacumule deve ser estável, conservativo e resistente a degradação. Por serem elementos da natureza, os metais são conservativos, sendo assimilados pelos organismos tanto sob a forma de íons em solução como sob a forma de complexos organometálicos. Neste caso, podem ter sua biodisponibilidade aumentada, facilitando sua bioacumulação. Formas ionizadas de metais, embora solúveis em água, aderem aos tecidos e são ativamente bioacumuladas pelo organismo (U.S. ARMY, 1989<sup>a</sup>). Em metais, a biomagnificação pode ser significativa para formas alquiladas hidrofóbicas, pois metais são internamente regulados por organismos superiores (BURATINI & BRANDELLI, 2006).

Tal como a partição de compostos orgânicos nos ambientes aquáticos, a partição, biodisponibilidade e a conseqüente toxicidade dos metais são processos de extrema

complexidade, sendo função de muitos fatores e propriedades dos ambientes em questão (ZAGATTO & MOZETO, 2006). Cátions inorgânicos presentes em vários ambientes podem influenciar a biodisponibilidade e disponibilizar os metais para a biota. Competição por sítios na superfície celular entre cátions normalmente presentes num *habitat* específico e as formas catiônicas de metais podem reduzir a toxicidade destes metais (BABICH & STOTZKY, 1983).

A incorporação de metais em complexos inorgânicos e organometálicos geralmente altera suas propriedades biológicas; tais modificações parecem ser responsáveis pelo aumento da toxicidade, devido ao aumento da biodisponibilidade, como também podem levar à diminuição da toxicidade (BONAVENTURAL & JOHNSON, 1997).

Esses conceitos resultam de numerosos mecanismos controlando o destino dos contaminantes químicos na coluna de água e/ou compartimentos de sedimento. A biodisponibilidade de metais está fortemente relacionada aos efeitos diretos e indiretos de fatores abióticos que determinam as reações de especiação, complexações com diferentes ligantes orgânicos e inorgânicos dissolvidos e fases particulares, e ao regime de exposição (TESSIER & TURNER, 1995).

Dentre os diversos contaminantes que geralmente ocorrem em ambientes aquáticos, os metais têm recebido atenção especial por se tratarem de contaminantes conservativos, não sendo biodegradados ou biotransformados, permanecendo como contaminantes persistentes dentro de ecossistemas e cadeias alimentares específicas (SMITH, 1993) e atravessando um ciclo hidrológico global, no qual a água é o principal caminho (TAM & WONG, 1995). Frente à expansão do aporte de metais, sua presença nos ecossistemas aquáticos tem despertado interesse sob vários aspectos, incluindo a avaliação do destino e os efeitos desses contaminantes, sua distribuição nas cadeias alimentares e sua ciclagem bioquímica (REINFELDER *et al*, 1998).

Nos sistemas aquáticos os metais estão presentes em vários compartimentos ou reservatórios. Uma descrição simplificada da posição dos metais nos ecossistemas aquáticos, feita por Salomons *et al* (1988), baseia-se em quatro reservatórios abióticos e três bióticos. Os sedimentos depositados, a água intersticial, o material em suspensão e a água superficial podem ser distinguidos como reservatórios abióticos. Sob condições redutoras, os sedimentos depositados podem fornecer à água intersticial altas concentrações de nutrientes e metais, o que pode influenciar na composição da água superficial através de processos de difusão, consolidação, erosão e bioturbação. Outra fonte importante de entrada é através da deposição por via seca (poeira) ou úmida (chuva, névoa, etc) na superfície dos lagos, Além disso, a

morfometria da bacia dos lagos é importante na determinação das interações sedimento-água e na produtividade resultante desses elementos. Formações geológicas e solos superficiais da bacia de drenagem são de grande importância para a entrada destes elementos no sistema e, conseqüentemente, na determinação da composição química do mesmo (BORG, 1995).

Segundo as características de mobilidade dos diferentes elementos, assim como sua habilidade em formar complexos e de se adsorver à partículas, Borg, em 1995, propôs uma classificação simplificada da performance dos metais mais estudados em águas de lagos naturais que auxilia na compreensão das condições de biodisponibilidade e da toxicidade dos metais:

- 1) Elementos presentes principalmente na forma dissolvida: Zn, Cd, Ni, Mn, As
- 2) Elementos presentes principalmente na forma de complexos orgânicos coloidais ou dissolvidos: Cu, Pb, Hg, Al, Fé
- 3) Elementos muito susceptíveis ao decréscimo de pH, relativo à mobilidade, sedimentação, concentração e especiação: Al, Mn, Zn, Cd, Ni, Be
- 4) Elementos presentes principalmente adsorvidos a partículas: Al, Fé, Bb, Cr
- 5) Elementos presentes principalmente na forma de compostos organometálicos formados por biometilação: Hg, As, Sn, Se, Pb, Ti, Cd

A descarga de metais em ambientes aquáticos pode levar a inúmeras respostas físicas, químicas e biológicas que, segundo Moore & Rammamorthy (1984), podem ser classificadas em duas categorias principais: (1) os efeitos do ambiente no metal e (2) os efeitos dos metais no ambiente. A primeira categoria enfatiza que as condições nas águas receptoras podem conduzir a uma mudança na especiação de materiais de origem geoquímica e antropogênica, qualidade de efluentes industriais e concentração de queladores e sólidos em suspensão. As respostas biológicas na segunda categoria são também freqüentemente diversas, sendo de grande interesse na ecotoxicologia. Dependendo das condições ambientais, pode haver mudanças na densidade, diversidade, estrutura da comunidade e composição das espécies da população. A natureza e extensão destas respostas biológicas dependem amplamente da concentração das espécies de metais e de processos físicos na água e sedimentos.

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 á 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 interagirem com material genético (COSTA, KRAKER & PATIERNO, 1984; KAZANTZIS & LILLY, 1986; NORSETH, 1988; WOO *et al*, 1988). A distribuição do metal entre suas diferentes formas químicas e físicas, as quais podem apresentar diferentes potenciais carcinogênicos, dão uma nova dimensão a esta incerteza. Experimentos com animais podem determinar se um dado metal em uma certa forma, dose e via de administração podem induzir câncer (MAGOS, 1991).

Testes *in vitro* têm auxiliado a identificar as formas ativas. Portanto, estudos em animais e testes *in vitro* não apenas complementam, mas também auxiliam a interpretar dados epidemiológicos e experimentais. Eles ainda confirmam a validade dos princípios básicos da toxicologia: não há efeito sem contato com o alvo. Considerando-se o alvo carcinogênico (na maior parte das vezes, material genético), para atingi-lo o metal carcinógeno precisa passar através da membrana celular. Além disso, não pode haver reações bioquímicas primárias com o alvo sem que o metal carcinógeno esteja em sua forma reativa (MAGOS, 1991).

Entretanto, a despeito do considerável progresso na identificação de metais carcinógenos, o mecanismo pelo qual metais exercem seus efeitos carcinogênicos continua um enigma pelas seguintes razões:

a) sistemas diferentes de avaliação *in vitro*, como células bacterianas e células de mamíferos, frequentemente dão resultados contraditórios (BAKER, 1984);

b) muitas condições experimentais, como administração intramuscular e doses únicas imensas, não são adequadas para a identificação de passos cruciais em processos multicelulares; e

c) como metais carcinogênicos muitas vezes identificados não possuem características químicas ou bioquímicas que possam ser encontradas em outros metais (FURST, 1987; SCHLATTER, 1984) não é provável que eles ajam por um mecanismo em comum, como, por exemplo, um importante grupo de químicos orgânicos age através da alquilação do DNA.

Do ponto de vista prático, diferenças na farmacocinética dos metais de uma espécie para outra em vias de administração, dose, e esquema de exposição podem contribuir para diferenças na resposta carcinogênica entre animais testados e na população humana exposta. Diferenças na dissolução, transporte através de membranas, fagocitose, modificações no estado de oxidação, e o sítio dessa modificação contribuem para esta relação. De qualquer modo, a exposição carcinogênica de metais é acompanhada de uma reação comum em animais experimentados e seres humanos (MAGOS, 1991).

Estudos epidemiológicos têm confirmado que os metais aumentam a incidência de câncer quando a exposição ocorre a nível tóxico (MAGOS, 1991), mas, de acordo com Weisburger & Williams, 1987, um agente químico é um provável risco para o câncer humano se ele é ativo de modo confiável numa bateria de testes de curta duração; é definitivamente ativo (alta incidência de neoplasmas específicos, num período latente de menos de 18 meses) em vários estudos *in vivo*; e exibe atividade em uma série de doses. Nenhum dos metais satisfaz todos esses requisitos.

A toxicidade de cada metal varia de acordo com a espécie, porém, segundo Ximenes, em 2006, existe uma toxicidade relativa dos metais mais comuns no meio ambiente, em ordem decrescente de periculosidade: mercúrio, prata, cobre, zinco, níquel, chumbo, cádmio, arsênio, cromo, estanho, ferro, manganês, alumínio, berílio e lítio.

Estudos epidemiológicos e experimentais têm mostrado que a exposição crônica a alguns metais possuem efeitos adversos na saúde humana e pode estar implicada na patogênese do câncer (SHI et al, 2004).

## 2.1 – Cobre

Segundo Moore e Ramamoorthy (1984), o Cobre é um metal macio e flexível, com uma condutividade elétrica e térmica alta. O cobre é amplamente distribuído na natureza em seu estado livre e em sulfitos, arsenitos, cloretos e carbonatos. Em ambientes aquáticos, o cobre ocorre tanto na forma solúvel como particulada e coloidal, sendo essas duas últimas as mais frequentes. A fração solúvel pode conter tanto o íon livre como o cobre complexado a ligantes orgânicos e inorgânicos. Seu transporte se dá principalmente na forma adsorvida, sendo adsorvido rapidamente aos sedimentos, resultando em níveis de resíduos muito altos. As taxas desta adsorção variam de acordo com o tipo de sedimento, pH, cátions competidores e a presença de ligantes e óxidos de Fe e Mn. A desorção, por sua vez, também depende de pH, salinidade e da presença de compostos quelantes naturais ou artificiais.

O cobre, normalmente, chega à água de consumo como resultado de corrosão dos materiais de encanamento, mas o contato com este metal pode ocorrer na agricultura em decorrência do uso de fungicidas e algicidas e nas indústrias de produção de cobre, de fabricação de fungicidas e na fundição de metais (BANU *et al.*, 2004).

Em pequenas quantidades, o Cobre é um elemento essencial para a atividade de diversas enzimas biológicas, enquanto que em doses maiores é considerado tóxico (BHUNYA & JENA,

1996). Sua importância como elemento essencial aos seres vivos pode ser avaliada pelo grande número de proteínas e enzimas dependentes desse metal, participando de inúmeros processos biológicos, onde desempenha funções variadas (KAIM & SCHWEDERSKI, 1995). Em algumas enzimas, o cobre tem papel antioxidante, catalisando a dismutação de radicais superóxido, enquanto nas oxidades, como tirosinase, catecol oxidase, amina oxidase ou galactose oxidase, catalisa a oxidação de vários substratos pelo oxigênio molecular, levando à formação de produtos carbonílicos (aldeído, quinonas, etc) e peróxido de hidrogênio (KAIM, 2003).

O corpo humano contém cerca de 80 mg de cobre, e apenas cerca de  $10^{-18}$  M destes íons estão livres no organismo, ou seja, não estão ligadas a uma proteína carreadora ou aminoácido. Isso significa menos de uma molécula livre por célula (VALENTINE & GRALLA, 1997). O cobre está distribuído em todas as organelas celulares, incluindo o núcleo, as mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático e citosol (CULOTTA, *et al.*, 1997), porém, é predominantemente encontrado no núcleo e nas mitocôndrias de células vivas (BANU *et al.*, 2004).

O cobre também é encontrado em muitos tecidos, em teores diferentes. O cérebro e o coração contêm uma concentração maior do que todos os demais exceto o fígado, que é responsável pelo armazenamento de cobre no organismo. Sua absorção é limitada no estômago e intestino delgado. Uma vez que o cobre entra na corrente sanguínea, ele fica ligado a uma variedade de proteínas e compostos de baixo peso molecular. Mais de 90% do cobre no plasma sanguíneo está presente incorporado à ceruloplasmina. O restante está coordenado à albumina e aminoácidos (SARKAR, 2000). Diversos complexos de cobre podem amplificar o estresse oxidativo conduzido por espécies parcialmente reduzidas de oxigênio, levando à injúria de moléculas essenciais como proteínas, lipídeos e DNA, sendo um importante estímulo para a apoptose (SHI, HUDSON & LIU, 2004).

Apesar de ser essencial a todos os organismos, o cobre é considerado altamente tóxico às algas, fungos, sementes de plantas e invertebrados, e moderadamente tóxico aos mamíferos (BOWEN, 1966). Relata-se, especialmente, sua toxicidade para invertebrados marinhos e de água doce, No entanto, esta toxicidade é geralmente maior para organismos de água doce do que para organismos marinhos, refletindo a relativa proporção de íons de cobre livres na solução (MOORE & RAMAMOORTHY, 1984).

Em mamíferos, a ingestão de grandes quantidades de cobre pode causar toxicidade sistêmica incluindo hemólise, necrose hepática, sangramento gastro-intestinal, proteinúria,

hematúria, taquicardia, convulsões, coma e morte (BANU *et al.*, 2004). O sulfato de cobre, derivado principalmente da indústria de couro e do branqueamento deste, está, ainda, relacionado com anemia histolítica não auto-imune (RUTSTEIN *et al.*, 1983).

A toxicidade crônica pelo cobre pode, também, ser resultado da ingestão em concentrações pequenas, mas que excedem as necessidades nutricionais. (PERRIN, 1990).

Um número de metais presentes no ambiente ocupacional tem sido reportado na carcinogênese humana, entretanto não foi verificada correlação positiva entre exposição ao cobre e câncer (LINDER, 1983). Em trabalhos realizados neste sentido, a ingestão intratesticular de sulfato de cobre induziu tumores testiculares em camundongos e galináceos, mas a administração intramuscular ou intraperitoneal de acetato de cobre e sulfeto de cobre não foram carcinogênicos em camundongos e ratos (WOO *et al.*, 1988). O Cu (III) foi negativo para o teste de adenoma de pulmão em camundongos (STONER *et al.*, 1976). Compostos coprosos, entretanto, suprimiram a carcinogenicidade da dietilnitrosamina, etionina, dimetilbenzeno, e o efeito promotor de ésteres de forbol (WOO *et al.*, 1988).

Poucos trabalhos testando a genotoxicidade desse composto foram realizados em peixes, porém Cavas, Garanko & Arkhipchuk (2005) verificaram em *Cyprinus carpio* e *Carassius gibelio*, que a dose 0,25 mg/L induziu aumento na frequência de micronúcleos em sangue periférico, células de brânquias e de fígado, com uma maior sensibilidade destes tecidos em comparação ao sangue periférico.

A Dose Letal de 50% (DL50) do Sulfato de Cobre via oral em ratos está estabelecida em 50mg/Kg. O crescimento de ratos foi retardado quando 30 mg/Kg de Sulfato de Cobre foi inserido em sua dieta (TOXNET, 1975-1986).

## 2.2 - Alumínio

O Alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre (NAYAK, 2002). O alumínio também está presente em pequenas quantidades em vários alimentos (GORMICAN, 1970; KOIVISTOINEN, 1980; SORENSON *et al.*, 1974), e compostos a base de Al, tanto solúveis como insolúveis, são permitidos como aditivos alimentícios em vários países (GANROT, 1986). Pequenas quantidades de Al<sup>3+</sup> são também liberadas de utensílios de cozinha de alumínio, e são dissolvidos na comida, particularmente quando o alimento é ácido. Além disso, o Al<sup>3+</sup> é comumente utilizado em purificação de água (LIONE, 1983).

Uma solução concentrada de oxicloreto de Al é muito comumente utilizada como antitranspirante. Sais de Al têm sido também utilizados como antisépticos, como o acetato de Al. Finalmente, compostos de Al são usados 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).

A média de alumínio ingerido por seres humanos varia de 5 mg a 3 g por dia (GREGGER, 1993). A fração de Al que atinge a circulação sistêmica e não é excretado pela urina rapidamente, se acumula em tecidos periféricos, onde se liga fortemente (WARD *et al.*, 2001).

Nenhuma informação confiável sobre o conteúdo normal de  $Al^{3+}$  no organismo humano está disponível. Investigações disponíveis apenas relatam a comparação entre vários tecidos, ou comparam tecidos saudáveis e doentes. Entretanto, essa padronização é muitas vezes inadequada. As provas julgadas confiáveis levam a crer que o conteúdo total no organismo humano saudável está entre 30 e 50 mg. Cerca da metade está presente no esqueleto e  $\frac{1}{4}$  nos pulmões (ALFREY, 1981; ALFREY, 1984; ALFREY, HEGG & CRASWELL, 1980; BURNEL *et al.*, 1982). Com exceção dos pulmões, todo  $Al^{3+}$  no organismo provavelmente se origina da ingestão de comida (GANROT, 1986).

A concentração de  $Al^{3+}$  aumenta com a idade nos tecidos pulmonares (ALFREY, 1980), fígado, rins e cérebro (MARKERBERY, *et al.*, 1981; TRAUB *et al.*, 1981).

Como muitos outros íons metálicos, a absorção de  $Al^{3+}$  provavelmente aumenta quando substâncias complexadas adequadas também estão presentes no intestino. Íons de alumínio, como  $Al^{3+}$ , são facilmente ligados a muitas substâncias e estruturas nos organismos. Portanto, seu metabolismo é determinado por sua afinidade a cada ligante e pela sua quantidade relativa e metabolismos (GANROT, 1986).

A distribuição intracelular do Al entre as organelas é variável, mas os lisossomos, mitocôndrias e núcleo são descritos como os principais sítios de ligação (DOBSON *et al.*, 1998).

A cromatina e DNA são as estruturas celulares mais vulneráveis ao  $Al^{3+}$ . O íon possui uma alta afinidade pelo DNA, assim como ao RNA e muitos mononucleotídeos, se ligando aos grupos fosfato. A quantidade de Al ligado é extremamente variável. Possivelmente, um complexo com Al/DNA -P em uma taxa de cerca de 1:3 é inicialmente formado. Entretanto, o excesso de Al pode aumentar esta taxa para mais de 2:1, mais provavelmente devido à ligação de íons OH. A ligação do  $Al^{3+}$  ao DNA é fortemente estável (MATSUMOTO *et al.*, 2004).

Seus efeitos tóxicos incluem deslocamento e/ou substituição de íons essenciais de sítios celulares e bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, como enzimas, polinucleotídeos e sistemas essenciais de transporte de nutrientes (ELOVAARA *et al*, 1995). Isto resulta na desnaturação e inativação de enzimas e ruptura da integridade da membrana de organelas celulares (OVREBO *et al*, 1995). Sabe-se, ainda, que metais interferem na gametogênese, inibem a embriogênese, e interrompem o desenvolvimento em diferentes estágios (AU *et al* 2001; FERNANDEZ & BEIRAS 2001). Muitos organismos podem inativar mecanismos de morte celular programada em resposta à excessiva acumulação de metais tóxicos (AGNELLO *et al*, 2007; SAMALI & COTTER, 1996).

Alguns exemplos conclusivos de efeitos em enzimas têm sido publicados. O efeito melhor documentado é provavelmente a inibição da hexoquinase (LAI & BLASS, 1984; NEET, FURMAN & HUESTON, 1982) o que causa a tendência de o ATP formar fortes complexos com  $Al^{3+}$  (SOLHEIM & FROMM, 1980). Isto implica que  $Al^{3+}$  pode afetar muitas outras reações enzimáticas onde o ATP é o substrato (STAURNES, SIGHOLT & REITE, 1984). Entre outras enzimas inibidas pelo  $Al^{3+}$  estão a adenilato ciclase (MANSOUR, EHRLICH & MANSOUR, 1983; STERNWEIS & GILMAN, 1982; TRAPP, 1980), fosfatase alcalina (REJ & BRETAUDIÈRE, 1980), acetilcolinesterase (MARQUIS & LERRICK, 1982), colinesterase sérica (MARQUIS, 1983) e ferroxidase (HUBER & FRIEDEN, 1970), entre outras.

O  $Al^{3+}$  é tóxico para a maior parte das espécies de plantas, e este íon dissolvido no solo tem sido considerado como um dos maiores fatores limitantes de crescimento em muitas partes do mundo (FOY, 1974). Vários mecanismos podem contribuir para isto, e o mais importante é, provavelmente, a pronta habilidade do  $Al^{3+}$  se ligar e prevenir a absorção de fosfatos inorgânicos pela raiz. Além disso, também parece inibir especificamente o crescimento das raízes (MORIMURA, TAKAHASHI & MATSUMOTO, 1978). Há, ainda, indicações de que níveis elevados de  $Al^{3+}$  em lagos causam uma séria, e às vezes, letal, intoxicação em pássaros que vivem nos arredores (NYHOLM, 1981), além de danos nas brânquias e mortes entre peixes jovens (BROWN, 1983).

Apesar de se saber que muitos metais induzem danos ao DNA, a informação relacionada ao Alumínio é escassa (LANKOFF *et al*, 2006).

Há evidências de que o Al 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 Al induz danos ao DNA não é conhecida, mas um

mecanismo provável é a indução de danos oxidativos. A exposição ao Al é responsável pela promoção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (YOUSEF, 2004). Além disso, este composto influencia a expressão gênica, altera fosforilação lipídica e inibe algumas enzimas celulares (LI *et al*, 1998).

Sob certas condições experimentais, o  $Al^{3+}$  demonstrou causar quebras cromossômicas e outras mutações cromossômicas em plantas, tanto durante a mitose quanto durante a meiose (OEHLKERS, 1953). Apesar de o Alumínio e seus compostos serem geralmente considerados como não carcinogênicos, há relatos de que a implantação subcutânea de uma folha de Al em ratos (O'GARA & BROWN, 1967) ou injeções subcutâneas de Alumínio dextran em camundongos (HADDOW & HORNING, 1960) produziram altas frequências de sarcoma. Linfócitos humanos tratados com  $AlCl_3$  por 72h demonstraram danos dose-dependentes no DNA observados pelo Ensaio cometa (LANKOFF *et al*, 2006). Padrões semelhantes foram observados em experimentos com o teste de micronúcleos (BANASIK *et al*, 2005).

A intoxicação experimental com  $Al^{3+}$  pode causar degeneração neurofibrilar (NFD) em gatos (CRAPPER, KRISHNAN & QUITTKAT, 1976), e coelhos (GALLE, CAMPOS & GIUDICELLI, 1983; GALLE & GIUDIECELLI, 1982). Em várias espécies, como humanos e ratos, o  $Al^{3+}$  parece não produzir facilmente NFD *in vivo*, mas foi induzido em culturas de células do córtex cerebral de fetos humanos (DEBONI, SEGER & CRAPPER, 1980) e com células de neuroblastoma de camundongos (MILLER & LEVINE, 1974). NFD é um depósito fibrilar próximo ao núcleo das células neuronais, consistindo em filamentos protéicos comprimidos em 10 nm. O mesmo tipo de NFD pode também ser induzido pela colchicina e inibidores do fuso mitótico similares (WISNIEWSKI & SOIFER, 1979) e maitansinóides (GHETTI & GAMBETTI, 1983). No caso do NFD induzido por  $Al^{3+}$ , paralelamente ao aumento dos depósitos fibrilares, há também um forte decréscimo, de cerca de 20 vezes, no número de microtúbulos nos neurônios afetados (CRAPPER & DALTON, 1973), assim como morte dos dendritos (PETIT, BIEDERMAN & MCMULLEN, 1980).

O  $Al^{3+}$  também é responsável pelo decréscimo da fluidez das membranas lipídicas no *Thermoplasma acidophilum*, tanto de membranas isoladas quanto de organismos completos (VIERSTRA & HAUG, 1978), além de inibir o *capping* em linfócitos de camundongos (MORITA, *et al*, 1982). A  $DL_{50}$  em ratos e camundongos é de cerca de 1mmole/kg, variando de 0,80 a 1,2 mmole/kg (SEIBERT & WELLS, 1979).

### **3 – Genotoxicidade**

Embora um dos mais importantes requisitos do material genético seja sua estabilidade, a capacidade de mudança também é necessária. Quando isso ocorre, considera-se que houve uma mutação (GARDNER & SNUSTAD, 1986).

Uma mutação trata-se de uma alteração súbita e herdável na estrutura do material genético. Como tal, as mutações são uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos, sendo de fato a única fonte de novas informações genéticas (BURNS & BOTTINO, 1988). Por outro lado, as mutações são, em sua maioria, deletérias. Muitos dos agentes mutagênicos mais potentes são também carcinogênicos. Portanto, se uma mutação se tornasse muito freqüente em uma espécie, ela criaria uma “carga genética” considerável, que, caso se tornasse muito grande, levaria à extinção dessa espécie (GARDNER E SNUSTAD, 1986).

Mutações ocorrem espontaneamente ou sob a influência de fatores externos, como substâncias químicas e radiações ionizantes. Há um grande número de testes de mutagenicidade de curta duração, que têm sido utilizados na tentativa de elucidar os mecanismos fundamentais da carcinogênese química (SHIMOI & TOMITA, 1991).

De uma maneira mais ampla, pode-se denominar os agentes que causam mutações de agentes genotóxicos, já que o termo “genotóxico” se refere a alterações letais e/ou hereditárias transmissíveis, tanto nas células somáticas quanto nas germinativas (VOGEL, 1989). Esse termo foi popularizado para denotar produtos químicos reativos com o DNA, em contraste com outros agentes carcinógenos que atuam se combinando aos receptores celulares (WEISBURGER & WILLIAMS, 2000).

Os agentes genotóxicos modificam funcionalmente ou estruturalmente o material genético. Esses agentes foram classificados por Vieira, em 1987: os agentes genotóxicos mutagênicos causam mutação em ponto, que consistem em pequenas alterações no DNA não visíveis ao microscópio óptico; os agentes genotóxicos clastogênicos induzem aberrações cromossômicas estruturais; e os agentes genotóxicos aneugênicos provocam aberrações cromossômicas numéricas.

Alguns desses compostos precisam ser metabolizados para exercerem sua ação genotóxica; desse modo, os agentes genotóxicos podem ser considerados agentes genotóxicos finais ou proximais. Os agentes genotóxicos finais consistem de compostos eletrofilicos capazes de se ligar aos centros nucleofílicos das moléculas informacionais sem qualquer

ativação metabólica, possuindo as propriedades intrínsecas necessárias para interagir com o material genético. Já os agentes genotóxicos proximais são compostos que não possuem propriedades genotóxicas por si, mas são convertidos pelo metabolismo celular em agentes genotóxicos finais. Assim, os agentes genotóxicos proximais, em geral, têm seus produtos metabólicos mais ativos do que os próprios (WRIGHT, 1980).

De fato, o metabolismo desempenha papéis importantes na carcinogênese química, atuando tanto na ativação quanto na inativação de substâncias. Essas enzimas estão presentes no organismo para remover produtos naturais (como alcalóides, esteróides e terpenos) presentes normalmente na dieta. Outras substâncias, como drogas, produtos químicos industriais, e etc, são reconhecidos por uma similaridade geral, e intermediários reativos são partes não planejadas do esforço metabólico de removê-los (JAKOBY, 1980; GUENGERICH, 2001).

Enzimas de fase I promovem oxidação e/ou redução, o que pode gerar produtos reativos (DIX & MARNETT, 1983). O Citocromo P450, uma das mais importantes enzimas hepáticas de fase I, é responsável por reações específicas de ativação e detoxicação de cerca de 90% dos carcinógenos conhecidos e de outros agentes tóxicos (BLAKE *et al.*, 1996; GUENGERICH, 1978; GUENGERICH *et al.*, 1982; GUENGERICH & SHIMADA, 1991). As enzimas de fase II são consideradas enzimas de conjugação, e participam de várias reações de detoxicação de carcinógenos (GUENGERICH, 1997). Entretanto, essas enzimas de conjugação também podem ativar pró-carcinógenos, e algumas de suas reações foram encontradas no processo de promoção e iniciação tumoral (BOBERG *et al.*, 1987;; MILLER & MILLER, 1966; WEISBURGER *et al.*, 1964).

Carcinógenos podem ser enzimaticamente ativados, se transformando em eletrófilos reativos que podem se ligar ao DNA e causar mutações e câncer. As mesmas enzimas podem também detoxicar os mesmos pró-carcinógenos. Entretanto, isso não se aplica a todas as substâncias. Alguns agentes químicos agem se ligando diretamente aos receptores, aumentando a transcrição de genes específicos. Em outros casos, os produtos do metabolismo aparentemente não se ligam covalentemente, mas conseguem se ligar fortemente a certas proteínas e causar respostas tóxicas (BORGHOFF *et al.*, 1990).

De acordo com Griffiths *et al.* (2002), os mutágenos induzem mutações por mecanismos diferentes, como a substituição de uma base nitrogenada no DNA, alteração de uma base de modo que ela especifique um pareamento errado com outra base, bem como pela modificação de uma base, de uma maneira que essa não mais possa se parear com qualquer outra base nitrogenada sob condições normais. Os danos ao DNA, que originam as mutações são eventos

simples, relativamente freqüentes e podem resultar da ação de agentes físicos (radiações ionizantes e não ionizantes), químicos (substâncias genotóxicas existentes na natureza ou introduzidas pelo homem), ou serem sintetizados endogenamente como espécies ativas de oxigênio e em processos inflamatórios, bem como serem provenientes de mutações espontâneas que podem surgir de eventos normais. As substâncias mutagênicas são capazes de iniciar a transformação maligna da célula, enquanto um outro grupo de substâncias não genotóxicas ou epigenéticas, conhecidas como promotores, potencializam o efeito carcinogênico dos iniciadores quando aplicados depois destes. Como os promotores dependem de uma ação prévia de um iniciador, eles são considerados carcinógenos incompletos. Em contrapartida, como os iniciadores genotóxicos podem *per se* levar ao tumor, eles são considerados carcinógenos completos. Entretanto, as substâncias genotóxicas só são carcinógenos completos, isto é, funcionam também como promotoras, em doses elevadas, freqüentemente letais para a célula, aplicadas continuamente. Para a iniciação basta uma única exposição a doses mais baixas, não letais (GOMES-CARNEIRO; RIBEIRO-PINTO & PAUMGARTTEN, 1997).

Tendo em vista que cerca de 80% do câncer humano é devido a causas ambientais, há uma grande preocupação com a relação entre carcinogênese e mutagênese desses compostos (BURNS & BOTTINO, 1988). Nas últimas décadas, inúmeros argumentos experimentais foram acumulados indicando o papel desempenhado por lesões produzidas no DNA como agentes causais de mutações, do desenvolvimento de diversos tipos de câncer, do aparecimento de mal-formações congênitas e de outros processos patológicos (LEITÃO & GOMES, 1994).

O monitoramento ambiental, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes, utilizando testes em sistemas biológicos, propicia promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

### **3.1 – Testes em Genética Toxicológica**

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. No intuito de estudar os efeitos de agentes químicos e radiações no DNA celular e nos cromossomos, tem sido desenvolvido um número expressivo de sistemas testes *in vitro* e *in vivo* (RIBEIRO & ANDRADE, 2003).

O uso de testes *in vitro* possui algumas dificuldades inerentes. Os testes com *Salmonella typhimurium* detectaram cerca de apenas metade da amostra de 55 carcinógenos para roedores, e mais de 30% de agentes não carcinógenos em roedores foram positivos neste teste (ASHBY, 1990). Como normalmente uma bateria de testes é usada, cada teste possuindo uma sensibilidade diferente, o resultado final é uma mistura de positivos e negativos. O mesmo material pode ser não mutagênico no teste com *Salmonella* e mutagênico em *Escherichia coli*; pode ser negativo em testes com bactérias, mas positivo em testes de mutação gênica em mamíferos (MAGOS, 1991). Os testes *in vivo* são especialmente relevantes para avaliar o risco genotóxico porque levam em consideração fatores como o metabolismo *in vivo*, farmacocinética e processos de reparo do DNA (KHRISHNA & HAYASHI, 2000).

#### **a) Teste de Micronúcleos *in vivo***

O teste de micronúcleos baseia-se na detecção de pequenos núcleos (micronúcleos) formados por fragmentos restantes de danos cromossômicos induzidos por agentes mutagênicos, ou por cromossomos que se atrasaram em relação ao fuso mitótico (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1973 E 1975; YAMAMOTO & KIKUCHI, 1980).

Os micronúcleos, também conhecidos na hematologia como corpúsculos de *Howel-Jolly*, são geralmente círculos regulares remanescentes da cromatina nuclear observada em eritrócitos (KHRISHNA & HAYASHI, 2000).

Os micronúcleos são formados durante a anáfase. Na presença de um agente clastogênico, ocorre a quebra de algum cromossomo, formando fragmentos acêntricos que se atrasam em relação aos elementos com centrômero, quando estes se ligam aos pólos do fuso. Se houver a presença de um agente aneugênico, ocorre uma disfunção no aparato mitótico, de modo que algumas cromátides podem também se atrasar em relação aos elementos com centrômero. Após a telófase, os cromossomos íntegros e os fragmentos de centrômeros dão origem aos núcleos filhos. Os elementos que se atrasam são incluídos nas células filhas, mas muitos se transformam em um ou vários núcleos secundários muito menores que o principal, recebendo a denominação de micronúcleos (HEDDLE & CARRANO, 1977; KHRISHNA & HAYASHI, 2000; SATO & TOMITA, 2001). Portanto, esse teste, quando realizado apropriadamente, é capaz de detectar tanto a clastogenicidade quanto a aneugenicidade (KHRISHNA & HAYASHI, 2000). Além disso, quando utilizado animais vivos, inclui fatores

como absorção, distribuição e metabolização da substância em avaliação (SATO & TOMITA, 2001).

Um aumento na frequência de eritrócitos micronucleados em animais tratados é uma indicação de indução de dano cromossômico, mas não é possível avaliar, nesse teste, o tipo de dano estrutural (KHRISHNA & HAYASHI, 2000).

Em mamíferos, o micronúcleo tem entre 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo e geralmente há um micronúcleo por célula (SCHMID, 1975; VINE, 1990). No caso específico dos peixes, devido ao tamanho reduzido dos cromossomos em algumas espécies, esta proporção passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (AL-SABTI & METCALFE, 1995; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO *et al.*, 2001).

Uma vez que os micronúcleos são decorrentes de cromossomos ou quebras cromossômicas que foram perdidos no processo de divisão celular, a frequência dos mesmos se encontra comprometida em populações que não estão em processo de divisão (HEDDLE, 1983). Portanto, este teste só pode ser realizado em populações de células que tenham a capacidade de entrarem em divisão.

Preferencialmente, a análise deve ser feita após um único ciclo de divisão, em virtude da incerteza da permanência destas estruturas por mais de um ciclo (FENECH, 2000). Uma vez que a formação dos micronúcleos só pode ser observada depois da ocorrência da divisão celular, as frequências destes em um conjunto de células são dependentes do tempo que a célula leva para entrar em divisão, do tipo do tecido, da espécie que está sendo usada para o teste e de condições ambientais. Portanto, são necessários um controle e conhecimento prévio da cinética de divisão celular que será utilizada para o teste (AL-SABTI & METCALFE, 1995; FENECH, 2000).

HOOFTMAN e DE RAAT (1982), tomando por base o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido por SCHMID (1975) para células da medula óssea de camundongos, introduziram-no nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como Teste do Micronúcleo Píscico (CARRASCO, TILBURY & MYERS, 1990).

Para HOSE *et al.* (1987) este teste revelou grandes potencialidades por ser de rápida execução, não dispendioso e um excelente indicador da contaminação química dos peixes, sendo aplicável a qualquer espécie de peixe, independente de suas características cariotípicas.

Desde o início de seus trabalhos, com o teste do micronúcleo com peixes, Hooftman e De Raat (1982) fizeram observações sobre alterações morfológicas nos núcleos eritrocitários, os quais normalmente são elípticos, mas que em alguns casos perdiam esta forma usual.

HOSE *et al.* (1987) descreveram alterações morfológicas nos núcleos de eritrócitos circulantes de peixes. Estas alterações são passíveis de serem utilizadas como indicadores dos efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água ao serem incluídas nas contagens dos micronúcleos.

Estas alterações podem ser classificadas como:

- a) *Blebbled* (núcleos em bolha): núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. Estas evaginações tomam o formato de delicadas protusões a estruturas em hastes completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- b) *Lobed* (núcleos lobados): núcleos com evaginações mais largas e menos definidas do que as descritas para os *Blebbled*. Englobam um *continuum* de morfologia que varia de pequenos “inchaços” na superfície do núcleo até a presença de múltiplos lobos, tomando a forma de halteres ou de trevos.
- c) *Vacuolated* (núcleos vacuolizados): núcleos que apresentam uma região com “vacúolos”, que se tratam de cavidades bem definidas destituídas de qualquer material visível no seu interior. Os vacúolos costumam ser demarcados por uma membrana e têm um diâmetro relativamente consistente entre todas as observações.
- d) *Notched* (núcleos entalhados): núcleos que apresentam uma fenda bem definida, geralmente com uma profundidade apreciável, que parecem não possuir nenhum material nuclear e são delimitados pelo envelope nuclear (CARRASCO, TYLBURY & MYERS, 1990).

O teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem se mostrado uma técnica promissora em investigações de mutagênese com causas ambientais (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

### **b) Ensaio Cometa**

Vários experimentos têm sido desenvolvidos para mesurar a quebra das fitas de DNA, como o teste do cometa. Estes testes têm sido usados em estudos toxicológicos, em sangue e tecidos como o fígado após a destruição da amostra (WALKER, 1998).

O Ensaio Cometa, também conhecido por SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas. Enquanto os princípios básicos são idênticos, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas, baseadas tanto na versão neutra de Ostling & Johanson (1984) como na versão alcalina de Singh *et al* (1988). As maiores variáveis técnicas que podem interferir com a sensibilidade e o poder de resolução do teste são: a concentração da agarose de baixo ponto de fusão; a composição da solução de lise; a composição do pH do tampão da eletroforese e as condições eletroforéticas, tais como voltagem, amperagem e duração (RIBEIRO & ANDRADE, 2003).

O teste do cometa mede quebras de fitas simples e duplas em células individuais (FAIRBAIRN *et al*, 1995; SAZAKI *et al*, 1999; SING *et al*, 1988). As quebras de fitas de DNA são produzidas tanto diretamente, pelo tratamento, como durante o reparo por excisão de aductos de DNA (SPEIT & HARTMANN, 1995).

A denominação do teste é baseada na aparência das células com o rastro da cauda do DNA, lembrando a forma de um cometa. Para a detecção de quebras de fita simples, a lise alcalina e o tampão de eletroforese com  $\text{pH} > 13$  são recomendados. Estas condições facilitam o desenovelamento da dupla fita de DNA e a expressão dos sítios álcali-lábeis. Sob condições de pH neutro (aproximadamente 9), por outro lado, a extensão da migração do DNA é proporcional às quebras de fita dupla (RIBEIRO & ANDRADE, 2003).

O comportamento do DNA em células individualizadas leva em conta sua organização dentro do núcleo. Para ser compactado, o DNA forma alças de 5-200 Kpb em seu enovelamento com proteínas histônicas, as quais são aderidas a uma rede protéica (COOK & BRAZELL, 1976/1978; ERIKSSON *et al*, 2002; RAZIN *et al*, 1995). Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, designada como nucleóide (COOK & BRAZELL, 1976). Dentre as poucas proteínas que resistem a essa extração, estão as proteínas da matriz nuclear (OLIVE & BANÁTH, 1995).

O ensaio cometa pode ser uma ferramenta interessante para monitoramentos na demonstração de genotoxicidade de exposições e para investigar os impactos na integridade do dano no DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental. Neste sentido, três principais vantagens podem ser identificadas: (i) qualquer tipo de tecido, de qualquer espécie, com células nucleadas pode ser usado, (ii) são necessárias pequenas quantidades de amostras,

(iii) o ensaio é rápido, sensível e relativamente barato (BELPAEME, COOREMAN & KIRSCH-VOLDERS, 1998; PROVOST *et al*, 1993; SINGH & STEPHENS, 1997).

Os tecidos mais pesquisados em peixes, além do sanguíneo, são do fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo, das brânquias, devido ao seu contínuo contato com a fase aquosa e do rim, tecido produtor de sangue em peixes (BELPAEME, COOREMAN & KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Este ensaio vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Entretanto, agentes químicos não álcali-lábeis que induzem lesões no DNA não são detectadas (RIBEIRO & ANDRADE, 2003). Além disso, o teste do cometa é usado não para detectar mutações, mas lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Estas lesões detectadas pelo teste do cometa são, portanto, passíveis de correção (BELPAEME, COOREMAN & KIRSCH-VOLDERS, 1998).

### **c) Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)**

A aplicação do método de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) em estudos biológicos tem se expandido rapidamente em vários campos do conhecimento, pelo fato deste ser extremamente valioso para a detecção e localização das seqüências de DNA de interesse, além da detecção e quantificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais (SAKAMOTO-HOJO *et al*, 1995).

A técnica de FISH envolve a marcação de nucleotídeos, fragmentos, ou seqüências de DNA específico, que é denominado de sonda. Posteriormente, este DNA-sonda liga-se à sua cadeia de DNA complementar (denominado DNA-alvo) em um cromossomo intacto. A localização deste DNA particular é feita com anticorpo marcado com um corante fluorescente, sendo observável ao microscópio de fluorescência como um sinal fluorescente. Ou seja, a técnica de hibridação *in situ* fluorescente permite a localização física precisa de genes ou seqüências de DNA diretamente nos cromossomos presentes nas preparações citológicas. Esta técnica, que tem como base a propriedade recombinante das cadeias complementares de DNA, foi desenvolvida no final da década de 60 e tem propiciado enorme progresso nos estudos da organização dos genomas.

O princípio do método se baseia no fato de que uma seqüência de DNA quimicamente modificada é capaz de anelar com uma seqüência de DNA ou RNA complementar nos tecidos

ou células fixadas. O processo de hibridação é alcançado após a desnaturação de ambas as seqüências de sonda e DNA-alvo. Sondas específicas para lócus gênico, geralmente com marcação direta, são empregadas, permitindo a detecção de alterações no número de cópias de genes específicos, além de amplificação (GRAY *et al.*, 1994) e fusões cêntricas (CHOPRA *et al.*, 1999; RUBNITZ *et al.*, 1999).

Esta técnica é baseada na descoberta de Gall e Pardue, em 1969, e John, Brinstiel e Jones (1969), que marcaram o RNA ribossomal hibridizado aos cromossomos acrocêntricos. Inicialmente, os isótopos radioativos foram usados para a técnica, entretanto, o uso dos fluorocromos é mais seguro, requer uma reação mais curta e pode proporcionar cores diferentes (MCNEIL & RIED, 2000).

A técnica de FISH tornou-se o método mais promissor dentro da Citogenética nos últimos anos. Os segmentos de DNA ou RNA, quimicamente modificados, são utilizados como sondas e reconhecem especificamente um único par cromossômico (*Chromosome Specific Probe* ou CSP), regiões específicas, tais como centrômeros e telômeros, ou até mesmo um loco sítio-específico (BÜHLER, 1989). O comprimento individual das sondas pode variar de poucos pares de base (oligonucleotídeos sintéticos) até acima de 1 Mpb (YACs). Sondas contendo elementos repetitivos, usadas para detectar regiões heterocromáticas e centroméricas de cromossomos individuais, são particularmente úteis na investigação de aberrações cromossômicas numéricas. O grande tamanho do alvo proporciona a detecção eficiente e permite a análise rapidamente. Já as sondas de cópia única podem ser clonadas em diferentes sistemas vetores (plasmídios, fagos, cosmídios, P1, BACS e YACs) que permitem variações no tamanho do inserto de 100pb até 1 Mpb. É aconselhável, entretanto, a utilização de sondas de DNA que tenham como alvo regiões cromossômicas maiores que 500 kb, para uma melhor visualização e detecção das mesmas. Diferentes fluorocromos em combinação, ou misturados em diferentes proporções, podem também ser utilizados para a detecção simultânea de sinais de diferentes cores (SWIGER & TUCKER, 1996; TUCKER *et al.*, 1995; WIEGANT *et al.*, 1993).

#### **d) Cometa-FISH**

Os genomas de organismos vivos estão continuamente em risco de sofrerem alterações estruturais endógenas e induzidas pelo ambiente. Lesões no DNA em sítios genômicos específicos podem levar a modificações na seqüência nucleotídica, causando mutagênese e respostas celulares que resultam em apoptose (SPIVAK *et al.*, 2008).

O teste Cometa (Eletroforese em gel de células únicas) tem sido empregado desde o início da década de 1980 para estudar os efeitos de poluentes ambientais e riscos ocupacionais, a segurança de compostos terapêuticos, na toxicologia e para acessar a capacidade de reparo do DNA em populações humanas, de animais e plantas (MOLLER, 2005 e 2006).

O teste Cometa, entretanto, permite apenas separar o DNA fragmentado do não fragmentado, enquanto o FISH auxilia a detectar seqüências específicas de DNA de interesse, incluindo cromossomos inteiros (LIEHR *et al.*, 2004).

O FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*) foi primeiramente usado em combinação com células em eletroforese em gel de agarose para estudar a localização espacial de várias estruturas cromossomais em fibras desenoveladas de DNA (SANTOS, SINGH & NATARAJAN, 1997). Logo depois, vários grupos aplicaram o FISH em cometas para pesquisas de danos ao DNA em seqüências específicas (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008). O termo “Cometa-FISH” foi proposto por Bock *et al.*, em 1999.

Santos, Singh & Natarajan, em 1997, foram os primeiros a descrever o método que combina o teste do Cometa com o FISH, mas este método foi desenvolvido simultaneamente em outros dois laboratórios (BOCK *et al.*, 1999; MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1998). A técnica Cometa-FISH é uma ferramenta útil para detectar danos e reparo gerais e em regiões específicas do DNA, combinando dois métodos bem estabelecidos (BAATOUT & DERRADJI, 2004; BARKER *et al.*, 2004; HUBER *et al.*, 2001).

A combinação das duas técnicas tem, portanto, sido utilizada no estudo da distribuição dos danos e reparo do DNA em todo o genoma (HORVATHOVA *et al.*, 2004) e na detecção de modificações de seqüências no DNA de células individuais (SANTOS, SINGH & NATARAJAN, 1997).

Desde seu desenvolvimento inicial, o Cometa-FISH tem sido usado para tratar de várias diferentes questões (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008). Primeiro, ele foi usado para identificar áreas específicas do cromossomo nas fibras do DNA e para determinar sua distribuição espacial (SANTOS, SINGH & NATARAJAN, 1997). Outras aplicações foram então detectar atividades de reparo de regiões específicas (HORVATHOVA *et al.*, 2004; MCKENNA *et al.*, 2003; MELLON *et al.*, 1986), efeitos genotóxicos no DNA total e nos telômeros (ARUTYUNYAN *et al.*, 2005), ou em genes tumorais relevantes, como o TP53 (SCHAEFERHENRICH *et al.*, 2003), além de alterações cromossomais específicas (HARREUS *et al.*, 2004), assim como instabilidade genética (TIRUKALIKUNDRAM,

KUMARAVEL & BRISTOW, 2005). O Cometa-FISH também tem sido usado para distinguir quebras na fita única ou dupla do DNA (FERNANDEZ *et al.*, 2001).

A análise comparativa de danos ao DNA pelo teste Cometa e pelo FISH nas mesmas amostras foi realizada em células sanguíneas humanas, tratadas com doxorubicina (ANDERSON, YU & BROWNE, 1997), linfócitos periféricos humanos e células pulmonares de Hamster Chinês tratados com metil metanosulfonato, ciclofosfamida e novos medicamentos (GIANNOTTI *et al.*, 2002; MONTEITH & VANSTONE, 1995), demonstrando alta correspondência de resultados, e aperfeiçoando, assim, a interpretação dos resultados (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008).

O Cometa-FISH usando sondas telômero-específicas de ácido nucléico peptídico (PNA) foi aplicado para a detecção de seqüências teloméricas no DNA danificado de células tratadas com bleomicina citostática (BLM), mitomicina C (MMS) e cisplatina (ARUTYUNYAN *et al.*, 2004 e 2005). Telômeros localizados fora do núcleo foram considerados como danificados. O nível de fragilidade telomérica foi mensurado em leucócitos humanos normais para prever efeitos não controlados de drogas em telômeros em tecidos não cancerosos de pacientes tratados. Os níveis comparativos de danos teloméricos e no DNA como um todo foram avaliados também em linhagens celulares de tumores (HOVHANNISYAN *et al.*, 2005).

Adicionalmente, neste estudo, a técnica Cometa-FISH foi capaz de revelar a maior fragilidade dos telômeros comparado ao DNA total em leucócitos humanos não tratados (ARUTYUNYAN *et al.*, 2005). Estes resultados refletem as descobertas de Santos, Singh & Natarajan, em 1997, reveladas pela investigação da ultraestrutura nuclear com FISH em cometas, que mostraram que telômeros estão concentrados principalmente próximos à membrana nuclear. A mesma localização espacial dos telômeros dá a eles uma maior chance de migração do núcleo após a indução de danos ao DNA (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008).

#### **4– Peixes**

Ambientes aquáticos servem como os maiores depósitos para a acumulação de contaminantes ambientais, incluindo carcinógenos, portanto, habitantes destes ambientes servem como sentinelas para a presença de toxicidade dos contaminantes destes ambientes (GERALD, LEBLANC & LISA, 1997).

Evidências implicando contaminantes ambientais como agentes causadores da ocorrência de neoplasias em peixes têm sido relatadas nas últimas quatro décadas (BLACK & BAUMANN, 1991; MIX, 1985). Estudos conduzidos durante a década atual continuam demonstrando que as populações de peixes são responsivas aos carcinógenos ambientais. As evidências demonstram que a elevada incidência de tumores em populações de peixes está relacionada à presença de carcinógenos químicos no ambiente.

O mais simples e definitivo biomarcador de neoplasias em peixes é a detecção visual de tumores. Entretanto, a detecção de tumores francos em populações de peixes é uma medição tardia da resposta à contaminantes ambientais, com sensibilidade maior apenas que o uso da mortalidade. Medições histopatológicas e moleculares de eventos iniciais no processo de carcinogênese podem aumentar a sensibilidade e detecção, e possivelmente sinalizar a ocorrência de exposição química na ausência de proliferação de doenças entre a população exposta (GERALD, LEBLANC & LISA, 1997).

Como o mais numeroso e filogeneticamente diversificado grupo de vertebrados, os peixes nos ensinam sobre importantes princípios fundamentais relacionados aos processos da evolução de vertebrados, o desenvolvimento e os processos de doenças. Por mais de 100 anos, peixes dos primitivos peixes-bruxa aos avançados peixes de recife têm rendido introspecções únicas na biologia celular, fisiologia, desenvolvimento e imunologia (KANE, GONZALEZ & REIMSCHUESSEL, 1996; POWERS, 1989; WALTER, 2001).

Um elevado nível de conservação dos programas genéticos de controle do desenvolvimento e de processos fisiológicos fundamentais está presente entre todos os vertebrados, bem como entre invertebrados e vertebrados. O sistema endócrino, por exemplo, é altamente conservado entre peixes e outros vertebrados. Peixes possuem a maioria dos tipos de tecidos de mamíferos, exceto mama, próstata e pulmão. Peixes têm servido como sentinelas úteis para detectar os riscos ambientais, bem como eficientes e rentáveis modelos para mecanismos toxicológicos e avaliação de riscos ao longo de várias décadas (HARSHBARGER, 1990; HATANAKA *et al*, 1982).

Na escolha de um sistema modelo para a condução de uma investigação em particular, é essencial perceber que nenhum único modelo é ótimo para enfrentar todas as questões biomédicas. Cada espécie tem pontos fortes e fracos únicos (WOODHEAD, 1989). Espécies aquáticas têm vantagens distintas como modelos para a investigação biomédica, incluindo custos pecuários muito mais baixos do que mamíferos (ZHANG *et al*, 2004).

Peixes têm demonstrado serem sensíveis a pequenos níveis de contaminantes no meio aquático (METCALFE, 1989; POWDERS, 1989; WALKER *et al*, 1985; GARNER *et al*, 1990; TWERDOK *et al*, 1997), além de recebem exposição dermal em função de sua imersão total na solução de exposição, e de a ingestão do material testado também ocorrer através da respiração e alimentação (MARGARET *et al*, 2001).

#### 4.1) *Rhamdia quelen*

O peixe jundiá (*Rhamdia quelen*), cujo cultivo vem crescendo progressivamente no Brasil, é uma espécie nativa, bem adaptada a diferentes ambientes e amplamente utilizada em viveiros de piscicultura (GOMES *et al.*, 2000). O jundiá suporta temperaturas de inverno e cresce bem no verão, podendo alcançar entre 600 a 800 g de peso em oito meses, quando em densidades de 2–4 peixes/m<sup>2</sup> (BARCELLOS *et al.*, 2004).

Esta espécie tem distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul (SILFVERGRIP, 1996). A sistemática do gênero *Rhamdia* é confusa desde que foi descrita. Em 1996, Silfvergrip realizou uma ampla revisão taxonômica do gênero, baseada em caracteres da morfologia interna, e concluiu que o gênero *Rhamdia* é formado de apenas 11 espécies dentre 100 anteriormente descritas. Segundo o mesmo autor, *Rhamdia quelen* pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe: Osteichthyes, Série: Teleostei, Ordem: Siluriformes, Família: Pimelodidae, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *Rhamdia quelen*.

A coloração do jundiá varia de marrom avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. Os barbilhões têm crescimento alométrico negativo e esta relação é provavelmente aumentada devido à grande possibilidade de dano dos barbilhões em exemplares grandes (SILFVERGRIP, 1996). O *Rhamdia quelen* vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (GUEDES, 1980). Em experimentos com larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e busca de locais escuros (PIAIA *et al.*, 1999). O melhor crescimento das larvas dessa espécie foi observado na faixa de pH de 8,0 a 8,5 (LOPES, 1998). Os alevinos também suportam níveis consideráveis de dureza por 96h, sem mortalidade (TOWNSEND *et al.*, 1997).

Adultos de *Rhamdia quelen* são onívoros, com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, e detritos orgânicos (GUEDES, 1980; MEURER & ZANIBONI FILHO, 1997). Essa espécie movimenta-se à noite e sai de seus esconderijos

depois das chuvas para se nutrir dos escombros deixados ao longo dos rios. Os organismos encontrados no conteúdo gastrintestinal de *Rhamdia quelen* não são restritos ao *habitat* bentônico, indicando que essa espécie é generalista com relação à escolha de alimento (GUEDES, 1980).

## II- OBJETIVOS

### a) Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da contaminação subcrônica via trófica por sulfato de cobre e sulfato de alumínio na espécie de peixe *Rhamdia quelen*.

### b) Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito genotóxico da contaminação subcrônica via trófica de três concentrações de sulfato de alumínio e de quatro concentrações de sulfato de cobre em *Rhamdia quelen* por meio do teste de micronúcleos píceos (MN) em hemácias periféricas;
- Avaliar o efeito genotóxico da contaminação subcrônica via trófica de três concentrações de sulfato de alumínio e de quatro concentrações de sulfato de cobre em *Rhamdia quelen* por meio do Ensaio Cometa em hemácias periféricas e nas células dos tecidos hepático, cerebral e renal;
- Comparar as respostas obtidas para os xenobiontes utilizados (sulfato de alumínio e sulfato de cobre) a fim de verificar a genotoxicidade e citotoxicidade em contaminação subcrônica;
- Adaptar a nova técnica de Cometa – FISH para nucleóides de peixes.

### **III- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1 – Contaminação dos animais**

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioensaios de Mutagênese Ambiental do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Os organismos utilizados foram peixes da espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá), obtidos através de pisciculturas em número aproximado de 176 exemplares. As pisciculturas escolhidas não apresentaram histórico de contaminação ou fontes próximas que pudessem fazê-lo.

Os animais foram aclimatados durante aproximadamente 30 dias em tanques de 100 litros, e separados para os bioensaios em aquários de 18 litros, contendo 2 exemplares. A temperatura da água foi mantida em torno de 28-29°C, e a aeração controlada.

Após a separação em duplas, os peixes foram condicionados a se alimentarem com doses únicas e individuais de ração preparada com gelatina comercial sem sabor.

Um total de 16 exemplares para cada grupo foram submetidos às concentrações de 5 mg/kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg Sulfato de Alumínio e 5 mg/kg, 30 mg/kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg de Sulfato de Cobre, paralelamente aos controles negativos acondicionado sob as mesmas condições de aeração, temperatura, luz e pH que os grupos tratados.

O tratamento trófico foi realizado com o contaminante (sulfato de alumínio ou sulfato de cobre) adicionado à uma ração especialmente preparada. Esta preparação consiste de ração comercial apropriada triturada, misturada à gelatina incolor sem sabor fabricada pela empresa Dr. Oetker ®. Os peixes receberam no ensaio o preparado de ração em dose única a cada três dias, perfazendo um total de 20 doses totais ao final do período de 60 dias de contaminação.

Foram delineados dois grupos para controle negativo, cada um com 16 animais. Um deles recebeu a alimentação apenas com ração comercial padrão, e o outro recebeu a ração preparada com gelatina comercial sem sabor, no mesmo esquema estabelecido para os grupos contaminados.

#### **2 –Obtenção de material**

Os animais foram anestesiados até a morte com Benzocaína diluída em etanol a 20%.

Com o auxílio de uma seringa U-100 para aplicação de insulina, com agulha 12,7mm x 0,3mm, heparinizada, retirou-se o sangue periférico através da veia caudal. O sangue coletado

destinou-se, então, parcialmente ao esfregaço para o teste dos micronúcleos. Do restante do material, aproximadamente 10µl foram diluídos em 1 ml de soro bovino fetal para a execução do teste cometa e do Cometa-FISH; cerca de 50µl do sangue foi diluído em Tampão Fosfato-Salino (PBS), com pH de 7.2, e destinado ao teste de viabilidade celular por Citometria de Fluxo.

Os tecidos hepático, cerebral e renal foram extraídos e inseridos no escuro em tubos *Eppendorf* contendo 1 ml de soro bovino fetal, e imediatamente utilizados.

### **3 – Teste de micronúcleos**

Para o teste de micronúcleos (MN) empregou-se a técnica descrita por Heddle, em 1973, e modificada por Carrasco *et al.*, em 1990.

Imediatamente após a coleta, cerca de 10 µl de sangue foi colocado em uma lâmina de vidro limpa e seca, seguido pela realização da técnica convencional do esfregaço. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos.

Alguns minutos antes de serem analisadas, as células foram coradas com 0.003% de uma solução de laranja de acridina diluída em tampão Sorenson em pH 6.8. Este material foi analisado em microscopia de fluorescência, sob uma ampliação de 100X. Um total de 2.000 hemácias por lâmina foram observadas quanto a presença de micronúcleos ou de anomalias nucleares, e diferenciadas segundo a concentração de RNA em Eritrócitos Policromáticos (EPC) e Eritrócitos Normocromáticos (ENC).

A análise estatística utilizou o teste Kruskal-Wallis. Esta análise foi realizada com o auxílio do software Bioestat 5.0.

### **4 – Ensaio Cometa**

A técnica utilizada para o Ensaio Cometa foi descrita por Singh *et al.*, em 1988, com modificações segundo Ferraro *et al.*, 2004.

Previamente, lâminas limpas foram cobertas com agarose de ponto de fusão normal (NMP) a 1,5% em PBS, e secas em temperatura ambiente em posição horizontal.

Os tecidos coletados foram dispostos em microtubos do tipo *Eppendorf* contendo 1 ml de Soro Bovino Fetal. Este material foi desagregado em homogeneizador Potter a 1500 rpm por

cerca de 30 segundos, e em seguida diluído na proporção de 10µl da solução de sangue para 120µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 0,5% em PBS a cerca de 37°C.

O tecido desagregado e diluído em LMP foi depositado sobre a lâmina previamente coberta com NMP, coberto com lamínula e acondicionado a cerca de 4°C por 10 – 20 min. Em seguida, as lamínulas foram gentilmente retiradas, e as lâminas acondicionadas em solução de lise a 4°C por um período de 72h. Cumprido o processo de lise, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese horizontal mantida a 4°C em recipiente com gelo, cobertas com tampão alcalino de eletroforese, por 25 minutos.

Os parâmetros da eletroforese foram acertados para 25 volts e 300 miliamperes, por 25 minutos. Em seguida, as lâminas foram submetidas a três sequências de 5 minutos de solução de neutralização.

A fixação foi realizada com etanol absoluto por 5 minutos. Para coloração, 20µl de brometo de etídio foram adicionados cerca de cinco minutos antes da análise em aumento de 400X em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação de rodamina (515 – 560 nm) e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas 100 células por exemplar, avaliadas de acordo com a intensidade da cauda e classificadas em 5 classes pré-definidas, variando de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo). Após quantificados, foram atribuídos escores através da somatória da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

A análise estatística utilizou o teste Kruskal-Wallis para comparar os grupos controle entre si, os grupos tratados entre si e com os grupos controles. Esta análise foi realizada com o auxílio do software Bioestat 5.0.

## **5 – Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em Cometa (Cometa-FISH)**

O teste FISH-Comet, ou Cometa-FISH, foi inicialmente proposto por Santos, Singh & Natarajan, em 1997, e utilizado por diversos outros grupos em células humanas, de camundongos, plantas e Hamster Chinês (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008; SPIVAK *et al.*, 2008). A metodologia desenvolvida no presente trabalho visou incluir análises com sondas teloméricas em tecidos píceos.

Para tanto, as lâminas de vidro a serem utilizadas foram lixadas com o auxílio de uma furadeira e lixa, de modo a gerar uma superfície irregular e otimizar a adesão da agarose.

A agarose para a camada-base foi preparada com 0,5% de agarose de Ponto de Fusão Normal (NMP) em Tampão Fosfato-Salina (PBS). Mantendo-a a uma temperatura média de cerca de 80°C em banho-maria, 100 µl foram pipetados em uma lâmina. Imediatamente esta agarose foi espalhada com o auxílio de uma lamínula de vidro de 24 x 32 mm, percorrendo toda a sua extensão. Estas lâminas foram secas *overnight*, ao ar livre.

No dia anterior à execução do teste, estas lâminas foram cobertas com uma segunda camada de agarose NMP a 1% em PBS.

A agarose NMP 1%, no momento do uso, foi fervida a 50°C e mantida a esta temperatura em banho-maria. Em seguida, pipetou-se 400µl, os quais foram distribuídos longitudinalmente nas lâminas pré-cobertas e rapidamente cobertos com lamínula de vidro de 24 x 32 mm.

Imediatamente após a segunda cobertura, as lâminas foram dispostas horizontalmente em bandejas de alumínio previamente geladas no freezer. Em seguida, estas lâminas foram armazenadas no freezer em um recipiente escuro e fechado, com algodão umedecido.

Após a extração dos tecidos e homogeneização destes em PBS, 1 volume da suspensão celular foi adicionada à 4 volumes da agarose LMP, e homogeneizadas com a própria pipeta. Rapidamente, 100µl da suspensão celular + LMP foram pipetados e dispostos longitudinalmente na lâmina previamente coberta. Imediatamente, a lâmina foi coberta com lamínula de vidro de 24 x 32 mm e disposta em uma bandeja de alumínio previamente gelada.

Após cerca de 5 minutos, as lamínulas foram removidas e colocadas em solução de lise previamente gelada.

A eletroforese subsequente foi feita com tampão alcalino, a 25V e 300 mA por 25 minutos, com a cuba imersa em gelo. As lâminas foram neutralizadas em três sessões de 5 minutos, e após secas, fixadas com etanol por 5 minutos.

As lâminas foram colocadas por 5 - 7 dias em etanol absoluto a 4°C. Então foram brevemente secas, sem deixar a agarose secar totalmente, e colocadas em água destilada por 10 minutos.

As células foram, em seguida, desnaturadas em 0.5M NaOH por 25 minutos e desidratadas em séries de etanol de 5 min cada, a 70%, 85% e álcool absoluto, todos a -20°C, e secar ao ar livre. Simultaneamente a desidratação em série alcoólica, a solução de hibridação foi desnaturada a 100°C por um período de 10 min e passada imediatamente ao gelo.

Para a hibridação, preparou-se a câmara úmida a 37°C; cada lâmina montada com 50µl de solução de hibridação e cobertas com lamínula, e deixadas *overnight* a 37°C.

As lâminas foram lavadas em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 10min. Em seguida, lavadas em 4xSSC + 0.5% Tween<sub>10</sub> gelado por 5 minutos.

As lâminas foram então incubadas em PBS contendo 1% soro bovino albumina (BSA) por 15 minutos á temperatura ambiente. Em seguida, lavadas por três vezes durante 5min com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com 100 µl de anti-digoxigenina rodamina conjugada (4µl Anti digoxi rodamina/796 µl NFDm) durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente. A diluição do anticorpo (anti-digoxigenina rodamina conjugada) foi de 5:1000.

As lâminas foram então lavadas por três vezes durante 5 minutos cada com Tween 0,5%/4xSSC, á temperatura ambiente , desidratadas em álcool 70, 85 e 100%, durante 5 minutos cada, e secas á temperatura ambiente.

De uma solução de 400 µl de antifading mais 1 µl de DAPI (0,2 mg/mL), foram colocadas 40µl da mistura em cada lâmina e coberta com lamínula. Devem ser analisadas 50 cometas por lâmina, quanto á localização na cabeça ou cauda dos sinais teloméricos.

## Capítulo I

**Exposição trófica ao Sulfato de Cobre no peixe *Rhamdia quelen* e avaliação cito e genotóxica.**

**Exposição trófica ao Sulfato de Cobre no peixe *Rhamdia quelen*  
e avaliação cito e genotóxica.**

Paula Moiana da Costa <sup>a\*</sup>, Lucas Ferrari de Andrade<sup>b</sup>, Edvaldo da Silva Trindade <sup>b</sup>, Helena Cristina de Assis <sup>c</sup>, Izonete Cristina Guiloski<sup>c</sup>, Marcus Vinícius M. Ferraro <sup>d</sup>, , Marta Margarete Cestari <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Genética, Laboratório de Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Farmacologia, Laboratório de Toxicologia Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>d</sup> Centro de Ciências da Educação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, PR, Brasil

\* Corresponding author at: Dpto. Genética, Setor de Ciências Biológicas, Jardim das Américas, UFPR, Centro Politécnico, Caixa Postal: 19071, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil. Tel.: +55 41 3361 1727; fax: +55 41 3361 1793. E-mail address: pmoicosta@gmail.com

### **Resumo**

Em pequenas quantidades, o cobre é um elemento essencial para a atividade de diversas enzimas biológicas, enquanto que em doses maiores é considerado altamente tóxico às algas, fungos, sementes de plantas e invertebrados, e moderadamente tóxico aos mamíferos. Relata-se, especialmente, sua toxicidade a invertebrados marinhos e de água doce. O objetivo do presente trabalho é verificar a genotoxicidade do sulfato de Cobre no bioindicador *Rhamdia quelen* em contaminação subcrônica via trófica. Para tal, os peixes foram separados em grupos e tratados durante 60 dias, perfazendo um total de 20 doses, com 5 mg/kg, 30 mg/Kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg de sulfato de Cobre inserido em ração especialmente preparada com gelatina comercial sem sabor. Os tecidos sanguíneo, hepático, renal e cerebral foram submetidos ao Ensaio Cometa alcalino, Teste de Micronúcleos Pisceos e Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo. Os resultados foram analisados através do teste de Kruskal - Wallis, e demonstraram que o tratamento induziu quebras no DNA deflagradas pelo ensaio cometa nos tecidos

cerebral, sanguíneo, renal e hepático, sendo o o sangue o tecido mais resistente ao contaminante. O teste de micronúcleos píceos não demonstrou alterações significativas em relação ao controle negativo, assim como a frequência de eritrócitos policromáticos em relação ao número de eritrócitos totais. O grupo com tratamento na dose de 500 mg/Kg teve uma mortalidade de 81.25% durante os 60 dias de contaminação. Não foi observado um aumento na frequência de células inviáveis no tecido sanguíneo.

Palavras – Chave: Ensaio Cometa, Teste de Micronucleos, Siluriforme, Metal.

## 1. Introdução

À medida que a humanidade aumenta sua capacidade tecnológica de intervir na natureza, surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente. Como consequência da industrialização, houve a disponibilização de uma grande diversidade de produtos químicos potencialmente tóxicos e a geração de resíduos em quantidade significativamente prejudicial ao ambiente (ZAGATTO, 2006).

Duas classes de poluentes são de enorme importância prática e econômica. Uma delas consiste nos resíduos de materiais radioativos. A outra trata-se da categoria dos poluentes inorgânicos dos metais. Estes elementos naturais, encontrados na crosta terrestre, são utilizados em muitos processos industriais, um uso que tem resultado em sua liberação em altas concentrações e em formas mais acessíveis do que é típico em sistemas naturais (BONAVENTURAL AND JOHNSON, 1997).

A toxicidade de cada metal varia de acordo com a espécie, porém, segundo Ximenes (2006), existe uma toxicidade relativa dos metais mais comuns no meio ambiente. Segundo esta classificação, o cobre é o terceiro metal em ordem decrescente de periculosidade.

O cobre está amplamente distribuído na natureza. Em ambientes aquáticos, ocorre tanto na forma solúvel como particulada e coloidal, sendo essas duas últimas as mais frequentes. A fração solúvel pode conter tanto o íon livre como o cobre complexado a ligantes orgânicos e inorgânicos. Seu transporte se dá principalmente na forma adsorvida, sendo adsorvido rapidamente aos sedimentos, resultando em níveis de resíduos muito altos (MOORE E RAMAMOORTHY, 1984)

Normalmente, o cobre chega à água de consumo como resultado de corrosão dos materiais de encanamento, mas o contato com este metal pode ocorrer na agricultura em decorrência do

uso de fungicidas e algicidas e nas indústrias de produção de cobre, de fabricação de fungicidas e na fundição de metais (BANU *et al.*, 2004). Sua importância como elemento essencial aos seres vivos pode ser avaliada pelo grande número de proteínas e enzimas dependentes desse metal, participando de inúmeros processos biológicos, onde desempenham funções variadas (KAIM & SCHWEDERSKI, 1995).

Apesar de ser essencial a todos os organismos, o cobre é considerado altamente tóxico às algas, fungos, sementes de plantas e invertebrados, e moderadamente tóxico aos mamíferos (BOWEN, 1966). Relata-se, especialmente, sua toxicidade a invertebrados marinhos e de água doce (MOORE & RAMAMOORTHY, 1984).

Em mamíferos, a ingestão de grandes quantidades de cobre pode causar toxicidade sistêmica incluindo hemólise, necrose hepática, sangramento gastro-intestinal, proteinúria, hematúria, taquicardia, convulsões, coma e morte (BANU *et al.*, 2004). O sulfato de cobre está, ainda, relacionado com anemia histolítica não auto-imune, derivado principalmente da indústria de couro e do branqueamento deste (RUTSTEIN *et al.*, 1983).

Neste trabalho utilizamos a espécie *Rhamdia quelen* (Siluriforme) para verificar a toxicidade do Sulfato de Cobre em exposição sub-crônica, por 60 dias, através do Ensaio Cometa, Teste do Micronúcleos Píscos e Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Tratamento**

Oitenta juvenis de *Rhamdia quelen*, adquiridos comercialmente, foram distribuídos em número de 16 peixes em seis grupos, a saber: controle negativo com ração comercial (CRC), controle negativo com o veículo utilizado para os tratamentos, que consistiu em ração comercial preparada com gelatina incolor sem sabor (CRG) e quatro grupos com tratamento subcrônico por via trófica com Sulfato de Cobre nas doses de 5mg/kg, 30 mg/Kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg de peso do peixe, durante 60 dias, perfazendo 20 doses. Os animais foram aclimatados durante aproximadamente 30 dias em tanques de 250 litros, após o que foram separados em duplas em aquários de 18 litros. A temperatura da água foi mantida em torno de 26°C, sob aeração e iluminação controladas (12h/12h claro/escuro). Após a separação em duplas, os peixes foram condicionados por 20 dias a se alimentarem com doses únicas e individuais de ração preparada com gelatina comercial sem sabor (Dr. Oetker®).

## 2.2 Amostras

Cada espécime foi anestesiado com benzocaína a 20% (Merck, Darmstadt, Alemanha), de acordo com as recomendações de Gontijo *et al*, 2006, e em seguida pesados, medidos e sexados. O sangue periférico foi retirado da veia caudal com auxílio de uma seringa U-100 e agulha 12,7mm x 0,3mm e heparinizada. Foram retirados 10µl de sangue que forma imediatamente diluídos em 1 ml de soro bovino fetal para a execução do teste cometa; cerca de 50µl do sangue foi diluído em Tampão Fosfato-Salino (PBS) (pH = 7.2), para o teste de viabilidade celular por Citometria de Fluxo. Cerca de 10 µl de sangue foi colocado em uma lâmina de vidro limpa e seca, seguido pela realização da técnica convencional do esfregaço para o Teste de Micronúcleos Pisceo. Os tecidos hepático, cerebral e renal foram extraídos e armazenados no escuro em tubos *Eppendorf* contendo 1 ml de soro bovino fetal, e imediatamente desagregados.

## 2.3 Ensaio cometa alcalino

A técnica utilizada para o Ensaio Cometa foi descrita por Singh *et al.*, em 1988, com modificações segundo Ferraro *et al.*, 2004 e Ramsdorf *et al*, 2009. 12 µl do sangue homogeneizado foram diluídos em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMA) e colocado em uma lâmina coberta por agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram submersas na 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 uma solução de NaOH (10 N) e de EDTA (200 mM), pH 13 por 25 minutos, para efetuar a desnaturação do DNA, e submetido então 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 10 min, os cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e analisados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Cem cometas em cada lâmina foram classificados visualmente como pertencendo a uma das cinco classes predefinidas, conferindo valores de 0 (sem danos) a 4 (dano máximo).

## 2.4 Teste do Micronúcleo Pisceo

Para o teste de micronúcleos (MN) empregou-se a técnica descrita por Heddle, em 1973 e Schmid (1975) e as alterações morfológicas nucleares foram analisadas segundo Carrasco *et al.* (1990). Imediatamente após a coleta, cerca de 10 µl de sangue foi colocado em uma lâmina de vidro limpa e seca, seguido pela realização do esfregaço. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos, e as células coradas com 10 µl de solução de 0.003% de laranja de acridina diluída em tampão Sorenson em pH 6.8. Este material foi analisado em microscopia de fluorescência, sob uma ampliação de 100X. Um total de 2.000 hemácias por lâmina foram observadas quanto à presença de micronúcleos e anomalias nucleares, e diferenciadas segundo a concentração de RNA em Eritrócitos Policromáticos (EPC) e Eritrócitos Normocromáticos (ENC), conforme Ueda *et al* (1992), modificada por Çavas *et al* (2005).

### **2.5 Citometria de fluxo**

A aquisição de dados de distinção entre células necróticas e viáveis foi realizada por uma análise com foco nas características morfológicas, presença de restos celulares e integridade de membrana em um citômetro FACScalibur equipado com um laser ion argônio a 488nm. Para as medidas, um total de 20.000 células foram coletadas de cada tubo de amostra usando programas CellQuest e WinMDI 2.9. Para avaliar a integridade de membrana, utilizou-se 7-amino-actinomicina D (7-AAD) 0,25µg/50µl de sangue, incubado por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro (SCHMID *et al*, 1994).

### **2.6 Análise estatística**

O teste de Kruskal-Wallis foi usado no ensaio cometa e no teste de micronúcleos píceos para comparar as diferenças entre os controles e as doses utilizadas (5 mg/Kg, 30 mg/Kg, 50 mg/Kg e 500mg/Kg). Em caso de significância, os dados foram submetidos ao teste de Dunn. Para a citometria de fluxo, os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) para determinar a significância estatística. O teste de Tukey foi executado quando os efeitos eram significativos. Para todos os testes, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **3. Resultados**

O grupo com tratamento na dose de 500 mg/Kg de sulfato de cobre, teve uma mortalidade de 81.25% durante os 60 dias de contaminação. Os indivíduos sobreviventes foram

os que se recusaram a ingerir a ração com sulfato de cobre. Portanto percebemos que esta dose (500mg/kg  $\text{CuSO}_4$ ) é muito tóxica para os jundiás, inviabilizando um bioensaio subcrônico

O Ensaio Cometa foi executado nos tecidos sanguíneo, hepático, cerebral e da porção anterior do rim. Os resultados obtidos não demonstraram diferenças em nenhum dos tecidos estudados quando comparados os dois grupos controle.

Os grupos que receberam as rações contaminadas por 60 dias nas doses de 5, 30 e 50mg/kg obtiveram danos maiores do que os exibidos pelos controles; entretanto, os tratamentos não induziram danos diferentes entre si.

No tecido sanguíneo, os escores observados na comparação entre as doses de sulfato de cobre foram semelhantes, mas apresentaram diferença em relação aos controles, com  $p=0,0002$ ;  $p=0,0001$  e  $p=0,0006$  para as doses de 5, 30 e 50 mg/Kg, respectivamente (Figura 1A). No tecido hepático os danos causados ao DNA pelas doses de 5 mg/Kg ( $p=0,01$ ), 30 mg/Kg ( $p=0,0009$ ) e 50 mg/Kg ( $p=0,0001$ ) também se mostraram maiores do que os obtidos nos controles. Entretanto, foi observada uma diferença entre as dosagens de 5 e 50mg/kg ( $p=0,005$ ), onde a segunda se mostrou mais prejudicial ao DNA (Figura 1B). No tecido renal os escores obtidos pelo Ensaio Cometa levaram a resultados diferentes dos escores obtidos pelos controles ( $p=0,0002$  para 5 mg/Kg;  $p=0,006$  para 30 mg/Kg e  $p<0,0001$  para 50 mg/Kg). A dose de 50 mg/Kg induziu mais danos do que a dose de 30 mg/Kg ( $p=0,009$ ) neste tecido (Figura 1C). O tecido cerebral não apresentou diferenças entre as doses de 5 e 30 mg/Kg, mas ambas ocasionaram danos maiores ao DNA do que os observados na dose de 50 mg/Kg ( $p=0,04$ ). As doses de 5 mg/Kg ( $p<0,0001$ ), 30 mg/Kg ( $p<0,0001$ ) e 50 mg/Kg ( $p=0,04$ ) apresentaram resultados diferentes dos obtidos nos controles negativos.

Na avaliação comparativa entre os tecidos nas três dosagens, os resultados mostraram que na dose de 5 mg/Kg o DNA do tecido cerebral mostrou-se mais afetado do que os outros tecidos, com  $p=0,02$  na comparação com o tecido sanguíneo,  $p<0,0001$  com o tecido hepático e  $p=0,02$  considerando-se a comparação com o tecido renal (Figura 2A). O mesmo se deu com a dose de 30 mg/Kg, onde observou-se no cérebro escores maiores do que os encontrados nos outros tecidos, com  $p=0,005$  para o sangue,  $p=0,001$  para o fígado e  $p<0,0001$  para o rim (Figura 2B). Em contraste com estes resultados, na maior dose de sulfato de cobre (50 mg/Kg), não houve diferença significativa entre os tecidos (Figura 2C), de forma semelhante aos resultados observados nos controles negativos (Figuras 2D e 2E).

Os micronúcleos e alterações nucleares foram analisadas de acordo com Carrasco *et al*, 1990. Estes autores dividem as lesões nucleares em Micronúcleos, Núcleos em Bolha (Blebbled), Núcleos Lobados (Lobed), Núcleos Vacuolados (Vacuolated) e Núcleos Entalhados (Notched), de acordo com sua morfologia. Tais lesões podem ser agrupadas de acordo com o significado destas em combinações MB (Micronúcleos e Blebbled), MBLN (Micronúcleos, Blebbled, Lobed e Notched) e VN (Vacuolated e Notched).

Pelo teste de micronúcleos písceos em eritrócitos de *Rhamdia quelen* após contaminação subcrônica via trófica por 60 dias com sulfato de cobre, a dose de 5mg/Kg gerou combinações MB ( $p=0,0001$ ) e VN ( $p=0,003$ ) que se mostraram diferentes da frequência de micronúcleos (Figura 3A). A dose de 30 mg/Kg obteve frequências das combinações MB ( $p=0,09$ ), MBLN ( $p<0,0001$ ) e VN ( $p=0,001$ ) diferentes da observada nos micronúcleos. A combinação MBLN foi encontrada em maior frequência do que a MB, com  $p=0,03$  (Figura 3B). Resultados semelhantes foram observados na dose de 50 mg/Kg, com  $p=0,03$  na comparação entre MN e MB,  $p<0,001$  entre MN e MBLN e  $p=0,003$  entre MN e VN (Figura 3C).

Considerando-se as alterações totais, a dose de 5 mg/Kg apresentou uma frequência menor do que na dose de 30mg/Kg, que por sua vez divergiu da dose de 50 mg/Kg ( $p<0,0001$ ) e dos controles. Não há, entretanto, diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos das doses de 5 e 50 mg/Kg e os grupos controle. Estes resultados podem ser observados na figura 3D.

Quando analisadas entre as diferentes doses (tabela 1), a combinação MB foi diferente entre as doses de 5 mg/Kg e 50 mg/Kg ( $p=0,001$ ), assim como entre 5 mg/Kg e os controles negativos. Resultados semelhantes foram observados na combinação de alterações VN ( $p=0,0001$ ). As lesões MBLN se mostraram diferentes entre as doses de 5 e 30 mg/Kg ( $p<0,0001$ ), e entre 30 e 50 mg/Kg ( $p=0,0004$ ). As demais foram semelhantes entre si e ao controle negativo.

Na tabela 2 podemos verificar as frequências das lesões nucleares de forma individualizada. Os núcleos em bolha tiveram uma prevalência maior na dose de 30 mg/Kg em relação ao controle. Os núcleos lobulados, por sua vez, mostraram diferenças significativas entre as doses de 5 e 50 mg/Kg, e 30 e 50 mg/Kg. As demais lesões (núcleos entalhados e vacuolizados) se mostraram semelhantes entre os tratamentos e controles.

A frequência de eritrócitos policromáticos em relação ao número de eritrócitos totais (%EPC), descrita na figura 4, se mostrou aumentada nas doses de 30 e 50 mg/Kg quando

comparadas com a dose de 5 mg/Kg. Entretanto, nenhuma das doses obteve frequências diferentes das observadas nos controles negativo.

Os resultados para o teste de viabilidade celular com 7-AAD não demonstraram diferenças na viabilidade das células tratadas com sulfato de cobre e o controle negativo (figura 5).

#### 4. Discussão

Diversos trabalhos com testes de toxicidade agudos e subagudos têm mostrado que o cobre é altamente tóxico a peixes (KEEHAE & GANG-JOON, 2009). Entretanto, poucos trabalhos testando a genotoxicidade desse composto foram realizados em peixes e nenhum, até o momento, em bioensaio trófico.

Chairi *et al* (2010) usou o teste cometa para analisar os danos causados pela injeção intraperitoneal de sulfato de cobre na concentração de 2 mg/Kg após 3h, 24h e 6 dias, em espécimes de *Solea senegalensis*, *Dicologlossa cuneata* e *Scophthalmus rhombus*, encontrando níveis cumulativos de genotoxicidade. O sulfato de cobre também induziu um aumento nos danos observados pelo ensaio cometa em eritrócitos de *Sparus aurata* (GABBIANELLI *et al*, 2003).

O trabalho mais recente em que foi utilizado o sulfato de cobre como controle positivo em uma espécie endêmica brasileira, *Geophagus brasiliensis*, foi de Benincá *et al* (2011). Os autores utilizaram 66 exemplares de *G. brasiliensis* distribuídos ao acaso em 3 aquários expostos às concentrações de 10  $\mu\text{M}$  ( $1 \times 10^{-5}$  g.L<sup>-1</sup>), 43  $\mu\text{M}$  ( $4,3 \times 10^{-5}$  g.L<sup>-1</sup>) e 100  $\mu\text{M}$  ( $1 \times 10^{-4}$  g.L<sup>-1</sup>) por 72 horas. Na maior dose, que correspondeu a 100 mg/l, todos os peixes morreram em 24 horas. Nas outras duas concentrações a diferença não foi significativa para o teste do micronúcleo písceo (MN + alterações nucleares), mas foi significativa para o ensaio cometa no tecido sanguíneo e no tecido renal.

O presente trabalho apresentou danos ao DNA que sugerem a genotoxicidade deste composto pelo ensaio cometa nas doses de 5, 30 e 50 mg/Kg, com resultados significativamente diferentes dos controles negativos. Não ocorreu, entretanto, um efeito acumulativo do sulfato de cobre, uma vez que os tratamentos não induziram danos diferentes entre si pelo teste do cometa. Isso pode se dar como consequência de possíveis diferenças de resistência e sensibilidade em espécies diversas, e também porque reações a uma exposição subcrônica são diferentes das observadas em exposições agudas. Na verdade, respostas tóxicas podem variar substancialmente de acordo com a espécie (KEEHAE & GANG-JOON, 2009).

Çavas & Ergene-Gozukara (2005), verificaram em *Cyprinus carpio* e *Carassius gibelio* que a dose 0,25 mg/L induziu aumento na frequência de micronúcleos e células binucleadas em sangue periférico, células de brânquias e de fígado, com uma maior sensibilidade destes tecidos em comparação ao sangue periférico. Nossos resultados corroboram este estudo; no ensaio cometa, o fígado apresentou danos maiores após o tratamento na dose de 50 mg/Kg quando comparado à dose de 5 mg/Kg, o que não ocorreu com o tecido sanguíneo (Figura 1). O fígado é um órgão-alvo para a detoxificação e armazenamento de metais em peixes (ARELLANO *et al*, 1999), e estudos prévios usando sulfato de cobre demonstraram danos significativos em hepatócitos (OLIVA *et al*, 2007, 2009; CHAIRI *et al*, 2010). Portanto, é razoável esperar que se trate de um tecido sensível a diferentes doses. O tecido renal e cerebral se mostraram tão sensíveis quanto o fígado, em detrimento ao sangue periférico. Este resultado demonstra a necessidade de se utilizar tecidos diversos em experimentos *in vivo* com o Ensaio Cometa.

Kamlesh & Sunil, em 2009, também encontraram um aumento na frequência de micronúcleos após a exposição de *Channa punctata* a doses subletais de Cu(III). Resultados semelhantes foram relatados por Bagdonas e Vosyliene (2006), quando expuseram a espécie *Oncorhynchus mykiss* a diferentes concentrações de Sulfato de cobre, assim como Talapatra e Banerjee (2007) em brânquias, rins e eritrócitos de *Labeo bata*. Bhunya e Pati (1987) também relataram um aumento dose-dependente na frequência de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos após exposição a sulfato de cobre. Em nosso trabalho, entretanto, não foram encontradas frequências significativas de micronúcleos em nenhuma das doses utilizadas.

Apesar de o teste de micronúcleos em amostras de sangue periférico ser particularmente indicado para condições de exposição crônica, como resultado do fato de que a circulação periférica reflete os eventos ocorridos no período de vida dos eritrócitos circulantes (UDROIU, 2006), há possíveis limitações para este uso. Resultados de estudos de exposição a longo prazo em peixes revelaram que a frequência de micronúcleos em eritrócitos decresce após 14 e 21 dias. Campana *et al* (1995) mostraram que a frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Cheirodon interruptus interruptus* tratados com ciclofosfamida decresceram gradualmente após 15 e 21 dias. Da mesma forma, Torres de Lemos *et al* (2001) descreveram que a indução de micronúcleos por cromo em eritrócitos de *Pimephales promelas* exibiu uma diminuição após 21 dias de exposição. Çavas *et al*, 2005, observaram que os eritrócitos são biomarcadores de genotoxicidade fracos para períodos de exposição acima de 21 dias. O período de 60 dias de

contaminação utilizado no presente trabalho pode ter contribuído, portanto, para a ausência de micronúcleos nas células analisadas.

Além disso, a sensibilidade da técnica de micronúcleos difere entre diferentes organismos e tipos celulares utilizados, uma vez que a expressão dos micronúcleos depende fortemente da atividade mitótica do tecido em estudo (BOLOGNESI & HAYASHI, 2011).

As alterações nucleares totais também não se mostraram significativamente diferentes da frequência observada no grupo controle nas doses de 5 e 50 mg/Kg (Figura 3).

Segundo Strunjak-Perovic *et al.* (2009), não há uma padronização e tampouco dados consistentes no que se refere à origem das anormalidades nucleares eritrocíticas. Não há, portanto, uma correlação bem estabelecida entre anormalidades nucleares e genotoxicidade. Segundo Carrasco *et al.* (1990), um dos grandes problemas com o teste de micronúcleos písceo é desenvolver uma forma de diferenciar lesões nucleares resultantes de mecanismos genotóxicos daquelas geradas por outros mecanismos.

Visando minimizar estes fatores, no presente trabalho foi realizado o ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo, capaz de separar células viáveis de necróticas. O resultado demonstrou que nas doses de 5, 30 e 50 mg/Kg de Sulfato de cobre, o tecido sanguíneo continha a mesma quantidade de células viáveis que o controle negativo. Isto sugere uma provável origem genotóxica para as alterações morfológicas nucleares.

Vários agentes genotóxicos, a certas concentrações, possuem propriedades citotóxicas e atuam diminuindo a eritropoiese, o que pode inclusive ser um fator de confusão e levar a falsos negativos (Udroiu, 2006). No presente trabalho, a frequência de eritrócitos policromáticos em relação ao número de eritrócitos totais (%EPC) se mostrou diminuída na dose de 5 mg/Kg, mas não foi significativamente diferente do observado nos grupos controle.

Existem relativamente poucos dados sobre exposição de Cobre na dieta em peixes. Sabe-se que a dose letal para a truta Arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) é maior que 10g/Kg, e os efeitos subletais ocorrem entre 1000 e 500 mg/Kg (HANDY, 1996; LANNON *et al.*, 1985; HANDY *et al.*, 1999; KAMUNDE *et al.*, 2001). Entretanto, os resultados obtidos mostram que para *Rhamdia quelen* a dose de 500 mg/Kg de sulfato de cobre é letal em exposição subcrônica por 60 dias. Este resultado nos leva a supor que a espécie *Rhamdia quelen* possa ser mais sensível a esta concentração de sulfato de cobre do que a espécie *Oncorhynchus mykiss*, o que sugere a necessidade de testar em espécies endêmicas brasileiras outras substâncias xenobióticas que não eliminam espécies consideradas exóticas no Brasil.

## **5. Conclusão**

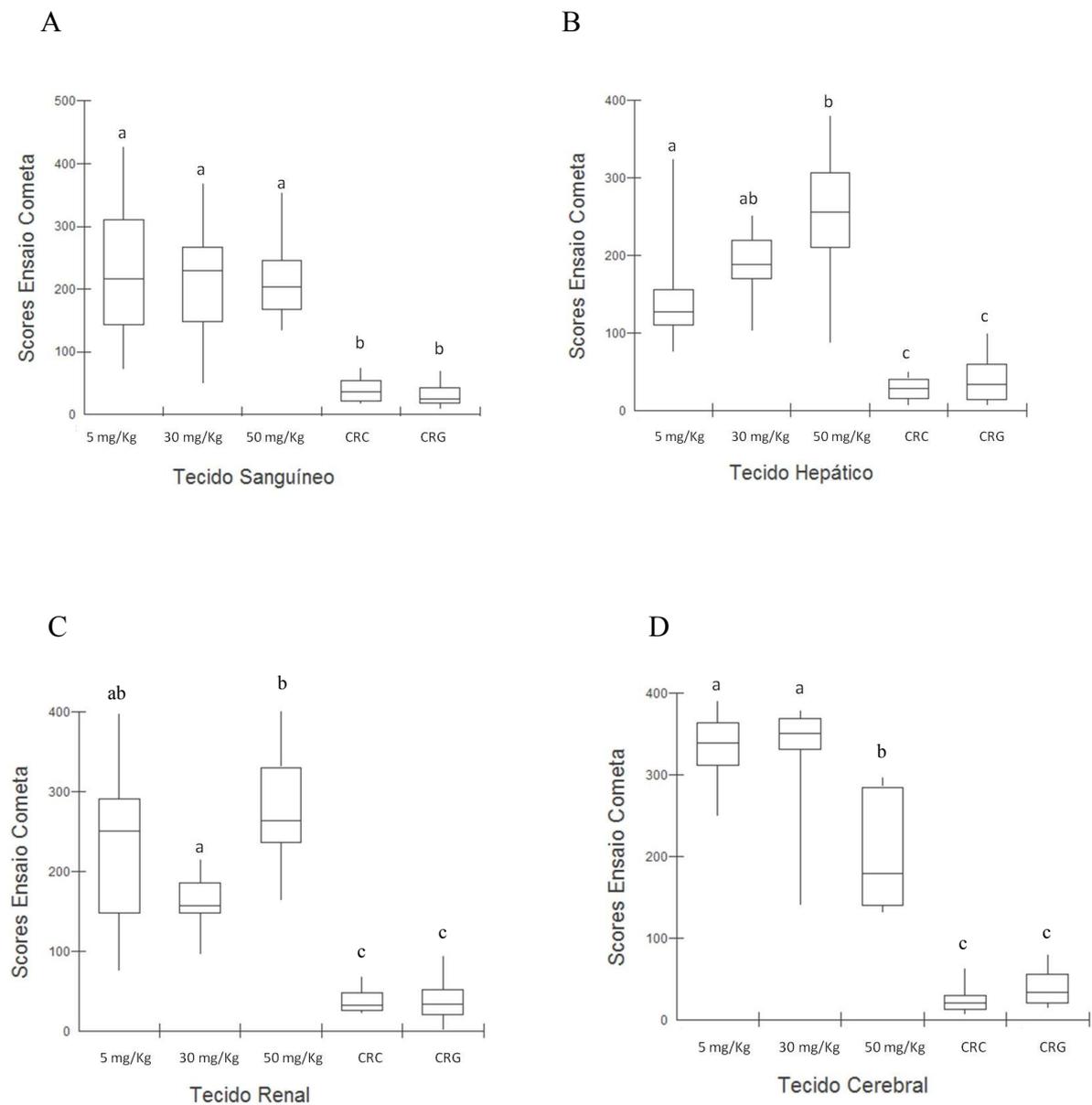
O Sulfato de Cobre em tratamento subcrônico por 60 dias via trófica em *Rhamdia quelen* nas doses de 5, 30, 50 e 500 mg/Kg induziu quebras no DNA deflagradas pelo ensaio cometa nos tecidos cerebral, sanguíneo, renal e hepático, sendo o sangue o tecido menos sensível a mudanças de concentração do sulfato de cobre. O teste de micronúcleos píceos, no entanto, não demonstrou alterações significativas em relação ao controle negativo, assim como a frequência de eritrócitos policromáticos em relação ao número de eritrócitos totais. Não foi observado um aumento na frequência de células inviáveis no tecido sanguíneo.

## **6. Referências Bibliográficas**

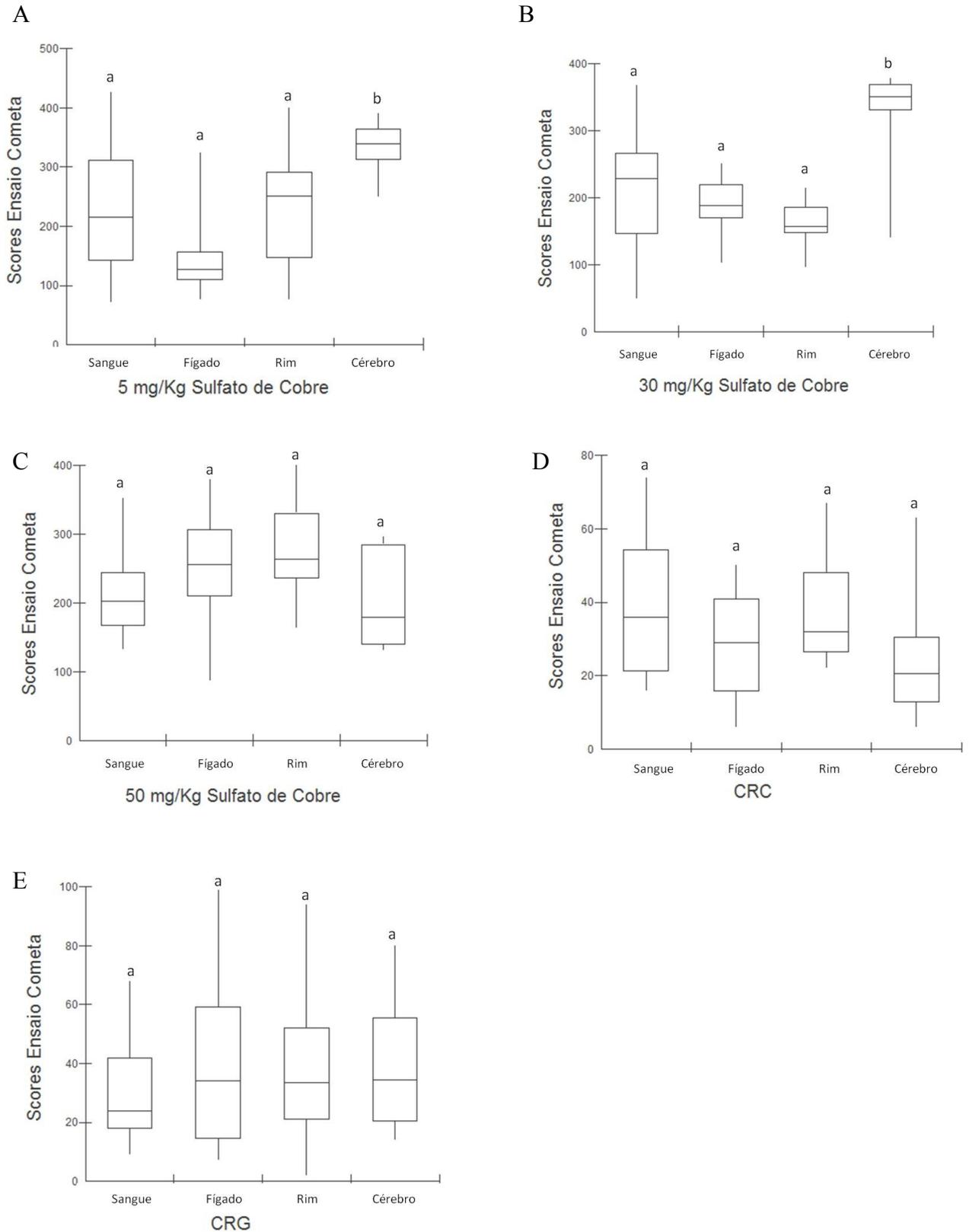
As referências citadas neste artigo estão listadas com as demais, ao final da tese.

## 7. Apêndices

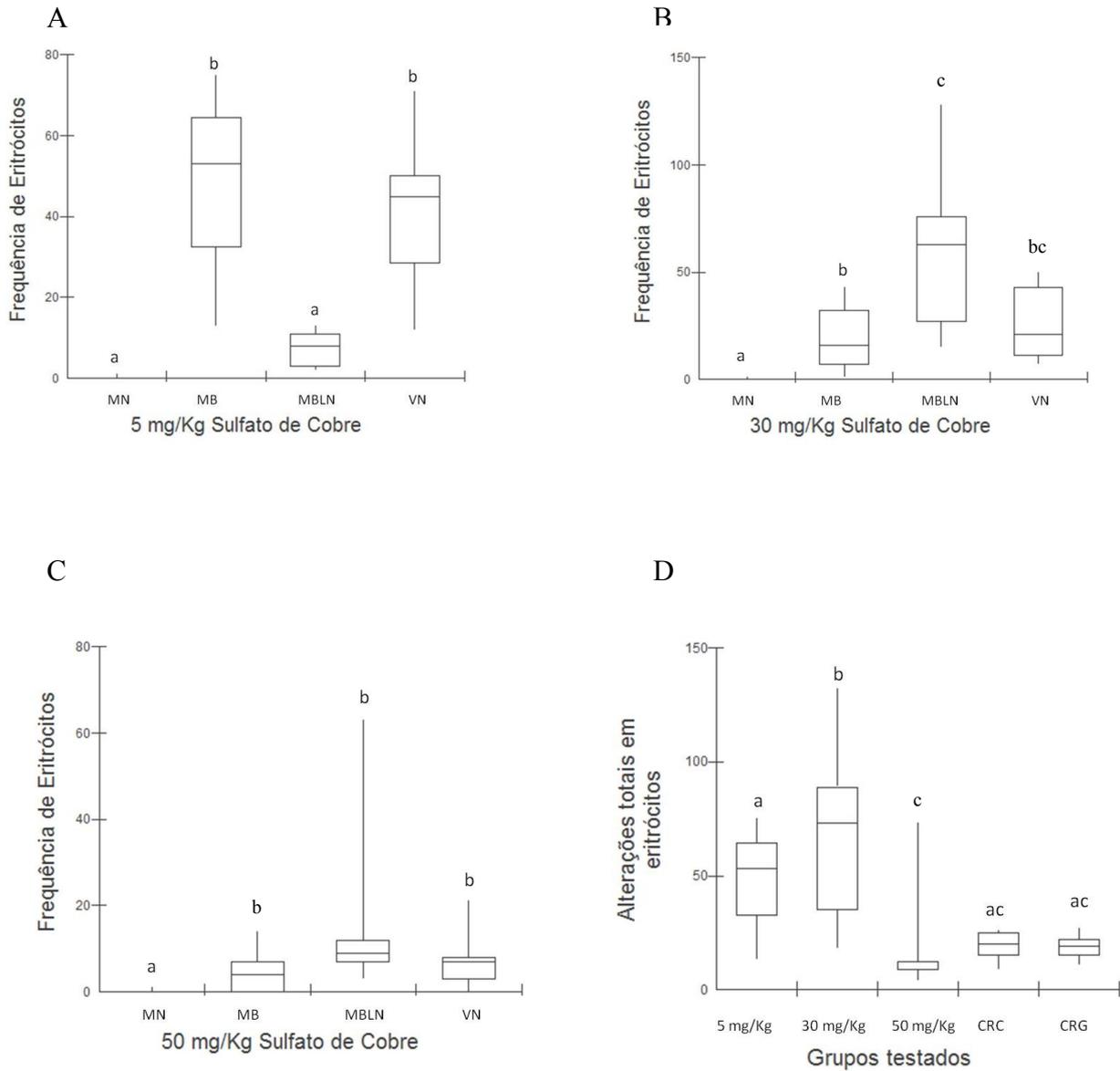
**Figura 1:** Comparação entre os danos observados no Ensaio Cometa referentes aos tecidos sanguíneo (A), hepático (B), renal (C) e cerebral (D) nas doses de 5, 30 e 50 mg/Kg de Sulfato de Cobre e controles. As letras indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .



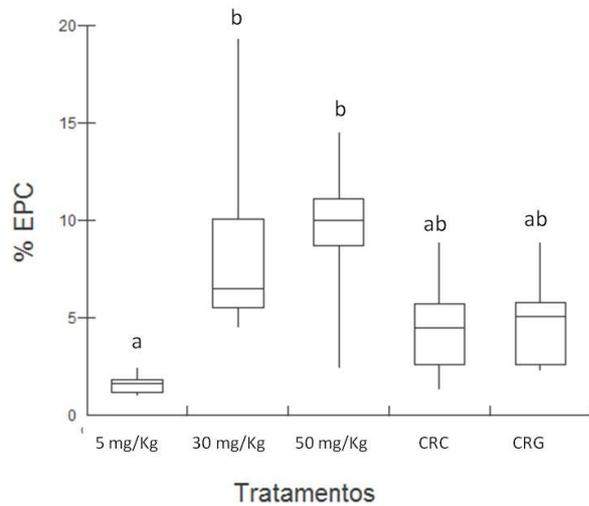
**Figura 2:** Comparação entre os danos observados no Ensaio Cometa referentes às doses de 5 mg/kg (A), 30 mg/kg (B) e 50 mg/Kg (C) de Sulfato de Cobre e controles com ração comercial padrão (D) e preparado com ração comercial padrão e gelatina (E). As letras indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .



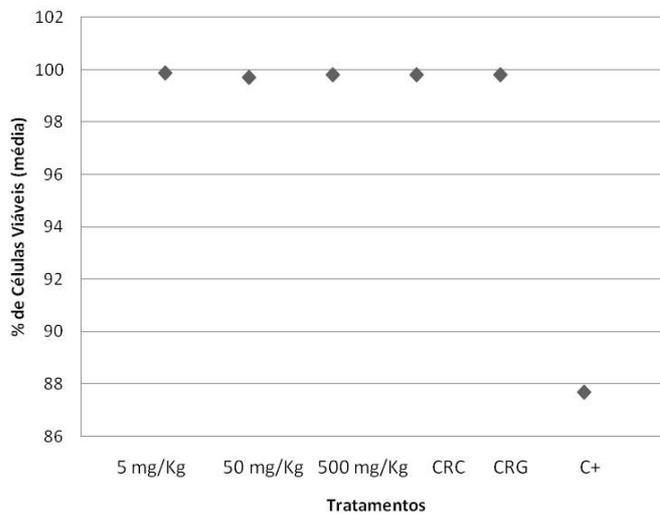
**Figura 3:** Comparação entre micronúcleos e combinações de lesões nucleares referentes às doses de 5 mg/kg (A), 30 mg/kg (B) e 50 mg/Kg (C) de Sulfato de Cobre, e alterações totais (D). As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .



**Figura 4:** Frequência de Eritrócitos Policromáticos (EPC) relativos aos eritrócitos totais referentes às doses de 5, 30 e 50 mg/Kg de Sulfato de Cobre e controles negativos CRC e CRG. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .



**Figura 5:** Percentagem de células sanguíneas viáveis como resultado da citometria de fluxo com 7-AAD.



**Tabela 1:** Frequência observada de combinações de lesões nucleares em relação ao total de alterações, e prevalência de alterações totais em relação ao número total de células analisadas. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas entre as doses dentro de cada combinação. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

<b>Combinação de Lesões M-B</b>		
<b>Dose de CuSO<sub>4</sub></b>	<b>Mediana ± quartis (25%/75%)</b>	<b>Prevalência (%)*</b>
5 mg/Kg	53.00 <sup>a</sup> ± 32.50/64.50	15.22
30 mg/Kg	16.00 <sup>ab</sup> ± 7.00/32.00	27.00
50 mg/Kg	4.00 <sup>bc</sup> ± 0.00/ 7.00	27.22
CRC	3.00 <sup>c</sup> ± 1.00/3.00	11.36
CRG	2.00 <sup>c</sup> ± 2.00/3.00	12.56

<b>Combinação de Lesões M-B-L-N</b>		
<b>Dose de CuSO<sub>4</sub></b>	<b>Mediana ± quartis (25%/75%)</b>	<b>Prevalência (%)*</b>
5 mg/Kg	8.00 <sup>a</sup> ± 3.00/11.00	85.07
30 mg/Kg	63.00 <sup>b</sup> ± 27.00/76.00	87.54
50 mg/Kg	9.00 <sup>a</sup> ± 7.00/12.00	84.62
CRC	15.00 <sup>a</sup> ± 10.00/20.00	76.14
CRG	14.00 <sup>a</sup> ± 11.00/16.00	75.30

<b>Combinação de Lesões V-N</b>		
<b>Dose de CuSO<sub>4</sub></b>	<b>Mediana ± quartis (25%/75%)</b>	<b>Prevalência (%)*</b>
5 mg/Kg	45.00 <sup>a</sup> ± 28.50/50.00	30.75
30 mg/Kg	21.00 <sup>ac</sup> ± 11.00/43.00	34.98
50 mg/Kg	7.00 <sup>bc</sup> ± 3.00/8.00	39.05
CRC	9.00 <sup>c</sup> ± 7.00/12.00	46.02
CRG	11.00 <sup>c</sup> ± 10.00/12.00	49.13

<b>Alterações Totais</b>		
<b>Dose de CuSO<sub>4</sub></b>	<b>Mediana ± quartis (25%/75%)</b>	<b>Prevalência (%)**</b>
5 mg/Kg	53.00 <sup>a</sup> ± 32.50/64.50	2.43
30 mg/Kg	73.00 <sup>b</sup> ± 35.00/89.00	4.54
50 mg/Kg	12.00 <sup>c</sup> ± 9.00/12.00	1.21
CRC	20.00 <sup>ac</sup> ± 15.00/25.00	2.15
CRG	19.00 <sup>ac</sup> ± 15.00/22.00	3.10

\* Frequência sobre o total de alterações

\*\* Frequência sobre o total de células

Tabela 2: Freqüência observada de micronúcleos e lesões nucleares em relação ao total de alterações. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas entre as doses dentro de cada tipo de lesão. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

	Micronúcleos	Núcleo Entalhado	Núcleo em Bolha	Núcleo Lobulado	Núcleo Vacuolizado
5 mg/Kg	0.30 <sup>a</sup>	15.82 <sup>a</sup>	14.92 <sup>ab</sup>	54.03 <sup>a</sup>	14.92 <sup>a</sup>
30 mg/Kg	0.32 <sup>a</sup>	8.31 <sup>a</sup>	26.68 <sup>a</sup>	52.24 <sup>a</sup>	12.46 <sup>a</sup>
50 mg/Kg	0.59 <sup>a</sup>	12.43 <sup>a</sup>	26.63 <sup>ab</sup>	44.97 <sup>b</sup>	15.38 <sup>a</sup>
CRC	1.14 <sup>a</sup>	13.07 <sup>a</sup>	10.23 <sup>b</sup>	51.70 <sup>ab</sup>	22.73 <sup>a</sup>
CRG	0.58 <sup>a</sup>	14.45 <sup>a</sup>	9.76 <sup>b</sup>	50.29 <sup>ab</sup>	24.92 <sup>a</sup>

## Capítulo II

**Avaliação da resposta citológica e genética de *Rhamdia quelen* submetida à exposição alimentar ao Sulfato de Alumínio.**

**Avaliação da resposta citológica e genética de *Rhamdia quelen* submetida à exposição alimentar ao Sulfato de Alumínio.**

Paula Moiana da Costa <sup>a\*</sup>, Emanuele Cristina Pesenti <sup>a</sup>, Tatiane Klingelfus <sup>a</sup>, Marina Isabel Mateus de Almeida <sup>a</sup>, Lucas Ferrari de Andrade<sup>b</sup>, Edvaldo da Silva Trindade <sup>b</sup>, Marcelo Ricardo Vicari <sup>c</sup>, Marta Margarete Cestari <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Genética, Laboratório de Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brasil

\* Corresponding author at: Dpto. Genética, Setor de Ciências Biológicas, Jardim das Américas, UFPR,

Centro Politécnico, Caixa Postal: 19071, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 3361 1727; fax: +55 41 3361 1793. E-mail address: pmoicosta@gmail.com

## Resumo

O alumínio está presente em pequenas quantidades nos organismos vivos, mas é abundante no ambiente. Entretanto, estudos mostram que o aumento do alumínio dissolvido na água causa danos nas brânquias e mortes de peixes, e a cromatina é apontada como sendo a estrutura celular mais vulnerável. O objetivo do presente trabalho é verificar a genotoxicidade do sulfato de Alumínio no bioindicador *Rhamdia quelen* em contaminação subcrônica via trófica. Para tal, os peixes foram separados em grupos e tratados durante 60 dias, perfazendo um total de 20 doses, com 5 mg/kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg de sulfato de alumínio inserido em ração especialmente preparada com gelatina comercial sem sabor. Os tecidos sanguíneo, hepático, renal e cerebral foram submetidos ao Ensaio Cometa alcalino, Teste de Micronúcleos Píscios e Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo. Os resultados foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, e demonstraram que o tratamento induziu quebras no DNA deflagradas pelo ensaio cometa nos tecidos cerebral, sanguíneo, renal e hepático, sendo o cérebro o tecido mais sensível ao contaminante e o sangue o mais resistente. O teste de micronúcleos píscios, no entanto, só obteve resultados positivos a partir da dose de 50 mg/Kg. Não foi observado um aumento na frequência de células inviáveis no tecido sanguíneo.

Palavras – Chave: Ensaio Cometa, Siluriforme, Metal.

## 1. Introdução

O alumínio (Al) está presente em pequenas quantidades nos organismos vivos, mas é abundante no ambiente, constituindo 8% da superfície terrestre (VERSTRAETEN *et al*, 2008). O alumínio também está presente em pequenas quantidades em vários alimentos (KOIVISTOINEN, 1980), e compostos a base de alumínio, tanto solúveis como insolúveis, são permitidos como aditivos alimentícios em vários países. Pequenas quantidades de sua forma iônica  $Al^{3+}$  são também liberados de utensílios de cozinha e dissolvidos na comida (SCHMITZ, 2006; CALLISTER, 2007). A média de alumínio ingerido por seres humanos varia de 5 mg a 3 g por dia (GREGER, 1993). A fração de Al que atinge a circulação sistêmica e não é excretado pela urina rapidamente, se acumula em tecidos periféricos, onde se liga fortemente (WARD *et al.*, 2001).

Uma solução concentrada de oxiclreto de alumínio é muito comumente utilizada como antitranspirante enquanto que o acetato de alumínio têm sido utilizado como antiséptico. Além disso, estes compostos são usados 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).

O sulfato de alumínio é comumente utilizado em purificação de água, e nenhum nível máximo aceitável está estabelecido (WAUER *et al*, 2004), apesar de que, nos últimos anos, um número crescente de efeitos tóxicos têm sido estabelecidos. Há indicações de que níveis elevados de Alumínio em lagos causam uma séria, e às vezes, letal, intoxicação em pássaros que vivem nos arredores (NYHOLM, 1981). O Alumínio é, ainda, tóxico para a maior parte das espécies de plantas, e quando em sua forma iônica dissolvido no solo tem sido considerado como um dos maiores fatores limitantes de crescimento destas, em muitas partes do mundo (FOY, 1974).

A intoxicação experimental com  $Al^{3+}$  pode causar degeneração neurofibrilar (NFD) em gatos (CRAPPER, KRISHNAN & QUITTKAT, 1976), e coelhos (GALLE, CAMPOS & GIUDICELLI, 1983). Em outras espécies, como humanos e ratos, o  $Al^{3+}$  parece não produzir facilmente NFD *in vivo*, embora esta tenha sido induzida em culturas de células do córtex cerebral de fetos humanos (DEBONI, SEGER & CRAPPER, 1980) e com células de neuroblastoma de camundongos (MILLER & LEVINE, 1974).

Seus efeitos tóxicos incluem deslocamento e/ou substituição de íons essenciais de sítios celulares e bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, como enzimas,

polinucleotídeos e sistemas essenciais de transporte de nutrientes (ELOVAARA *et al*, 1995). Isto resulta na desnaturação e inativação de enzimas e ruptura da integridade da membrana de organelas celulares (OVREBO *et al*, 1995). O  $Al^{3+}$  também é responsável pelo decréscimo da fluidez das membranas lipídicas no *Thermoplasma acidophilum*, tanto de membranas isoladas quanto de organismos completos (VIERSTRA & HAUG, 1978), além de inibir o *capping* em linfócitos de camundongos (MORITA, *et al*, 1982).

A distribuição intracelular do Al entre as organelas é variável, mas os lisossomos, mitocôndrias e núcleo são descritos como os principais sítios de ligação (DOBSON *et al.*, 1998). Muitos pontos apontam a cromatina e DNA como sendo as estruturas celulares mais vulneráveis ao alumínio. O íon  $Al^{3+}$  possui uma alta afinidade pelo DNA, assim como ao RNA e muitos mononucleotídeos, se ligando provavelmente aos grupos fosfato (MATSUMOTO *et al*, 2004).

Apesar de se saber que muitos metais induzem danos ao DNA, a informação relacionada ao Alumínio é escassa (LANKOFF *et al*, 2006). Entretanto, há evidências de que o Al 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 Al induz danos ao DNA não é conhecida, mas um mecanismo provável é a indução de danos oxidativos. A exposição ao Al é responsável pela promoção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (YOUSEF, 2004). Além disso, este composto influencia a expressão gênica, altera fosforilação lipídica e inibe algumas enzimas celulares (LI *et al*, 1998).

ob certas condições experimentais, o  $Al^{3+}$  demonstrou causar quebras cromossômicas e outras mutações cromossômicas em plantas, tanto durante a mitose quando durante a meiose (OEHLKERS, 1953). Em *Allium sativum*, o Sulfato de Alumínio em tratamento crônico induziu a depressão mitótica, alterações cromossômicas e ao aumento na frequência de células micronucleadas (ROY, SHARMA & TALUKDER, 1989). LIMA *et al.* (2007) relataram a citotoxicidade do alumínio e seu impacto no aparato do fuso mitótico em linfócitos humanos.

No que diz respeito aos organismos aquáticos, diversos trabalhos indicam que sua exposição ao alumínio pode afetar funções e estruturas celulares e moleculares, com efeitos citotóxicos e genotóxicos e com aumento da mortalidade. Estes efeitos foram constatados em estudos realizados com hydra (KOVACEVIC *et al.*, 2007) algas (CLAESSON & TORNQVIST, 1988; PARENT & CAMPBELL, 1994), Daphnia (HAVENS & HEATH, 1989), e diversos invertebrados aquáticos (HAVENS, 1993; SPARLING & LOWE, 1996). Çalta, em 1999, verificou a toxicidade do alumínio na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum).

Garcia-Medina *et al* (2011) descreveram os efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos pelo alumínio em linfócitos da carpa comum (*Cyprinus carpio*), e Ternjej *et al* (2010), relataram danos no DNA de células sanguíneas de *Gambusia holbrooki* após exposição a ambientes contaminados por alumínio.

Como peixes geralmente respondem de forma similar aos vertebrados superiores, eles podem ser usados para pesquisar xenobióticos que possuam potencial para causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos. Entretanto, a maior aplicação de sistemas modelo com peixes é determinar a distribuição e efeitos tóxicos de contaminantes químicos nos ambientes aquáticos, geralmente oriundos de despejos urbanos e industriais. Os peixes podem, também, funcionar como “sentinela” para indicar a potencial exposição de populações humanas a produtos genotóxicos em água potável. Além disso, a comida é a maior rota de exposição de populações humanas a substâncias tóxicas, e peixes têm sido reconhecidos como os maiores vetores para a transmissão de contaminantes para humanos (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Neste trabalho utilizamos a espécie *Rhamdia quelen* (Siluriforme) para verificar a toxicidade do Sulfato de Alumínio em exposição sub-crônica via trófica. É a primeira vez que foram realizados bioensaios acima de 96 horas de exposição e principalmente um trabalho de contaminação através do alimento em exemplares desta espécie. Foram utilizados os testes de Micronúcleos Píscios, Ensaio Cometa e Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo.

O peixe jundiá (*Rhamdia quelen*), cujo cultivo vem crescendo progressivamente no Brasil, é uma espécie nativa, com distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul (SILFVERGRIP, 1996). É uma espécie bem adaptada a diferentes ambientes e amplamente utilizada em viveiros de piscicultura (GOMES *et al.*, 2000).

Salvagni *et al*, 2011, verificaram o impacto genotóxico de pesticidas em comunidades agrícolas do estado de Santa Catarina, a partir de espécimes de *Rhamdia quelen* coletados. Ramsdorf (2011) estudou a genotoxicidade do fripronil, naftaleno e nitrato de chumbo por contaminação subcrônica nesta espécie. Ghisi *et al*, em 2011, realizaram o teste de genotoxicidade após contaminação sub-crônica do inseticida Fipronil em *Rhamdia quelen*. Pamplona *et al*, 2011, utilizou o *Rhamdia quelen* como biomarcador para verificar os efeitos da administração subcrônica de dipirona, incluindo os danos ao DNA. Estes trabalhos corroboram o estudo de Ferraro, em 2009, que concluiu que a espécie *Rhamdia quelen* se trata de um bom bioindicador em sistemas hídricos para testes de genotoxicidade.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Tratamento

Oitenta juvenis de *Rhamdia quelen*, adquiridos comercialmente, foram distribuídos em número de 16 peixes em cinco grupos, a saber: controle negativo com ração comercial (CRC), controle negativo com o veículo utilizado para os tratamentos, que consistiu em ração comercial preparada com gelatina incolor sem sabor (CRG) e três grupos com tratamento subcrônico por via trófica com Sulfato de Alumínio nas doses de 5mg/kg, 50 mg/kg e 500 mg/kg de peso do peixe, durante 60 dias, perfazendo 20 doses. Os animais foram aclimatados durante aproximadamente 30 dias em tanques de 250 litros, após o que foram separados em duplas em aquários de 18 litros. A temperatura da água foi mantida em torno de 26°C, sob aeração e iluminação controladas (12h/12h claro/escuro). Após a separação em duplas, os peixes foram condicionados por 20 dias a se alimentarem com doses únicas e individuais de ração preparada com gelatina comercial sem sabor (Dr. Oetker®).

### 2.2 Amostras

Cada espécime foi anestesiado com benzocaína a 20% (Merck, Darmstadt, Alemanha), de acordo com as recomendações de Gontijo *et al*, 2006, e em seguida pesados, medidos e sexados. O sangue periférico foi retirado da veia caudal com auxílio de uma seringa U-100 e agulha 12,7mm x 0,3mm e heparinizada. Foram retirados 10µl de sangue que forma imediatamente diluídos em 1 ml de soro bovino fetal para a execução do teste cometa; cerca de 50µl do sangue foi diluído em Tampão Fosfato-Salino (PBS) (pH = 7.2), para o teste de viabilidade celular por Citometria de Fluxo. Cerca de 10 µl de sangue foi colocado em uma lâmina de vidro limpa e seca, seguido pela realização da técnica convencional do esfregaço para o Teste de Micronúcleos Písceo. Os tecidos hepático, cerebral e renal foram extraídos e armazenados no escuro em tubos *Eppendorf* contendo 1 ml de soro bovino fetal, e imediatamente desagregados.

### 2.3 Ensaio cometa alcalino

A técnica utilizada para o Ensaio Cometa foi descrita por Singh *et al.*, em 1988, com modificações segundo Ferraro *et al.*, 2004 e Ramsdorf *et al*, 2009. 12 µl do sangue homogeneizado foram diluídos em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMA) e colocado em uma lâmina coberta por agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram

submersas na 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 uma solução de NaOH (10 N) e de EDTA (200 mM), pH 13 por 25 minutos, para efetuar a desnaturação do DNA, e submetido então 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 10 min, os cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e analisados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Cem cometas em cada lâmina foram classificados visualmente como pertencendo a uma das cinco classes predefinidas, conferindo valores de 0 (sem danos) a 4 (dano máximo).

#### **2.4 Teste do Micronúcleo Píscio**

Para o teste de micronúcleos (MN) empregou-se a técnica descrita por Heddle, em 1973 e Schmid (1975) e as alterações morfológicas nucleares foram analisadas segundo Carrasco *et al.* (1990). Imediatamente após a coleta, cerca de 10 µl de sangue foi colocado em uma lâmina de vidro limpa e seca, seguido pela realização do esfregaço. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos, e as células coradas com 10 µl de solução de 0.003% de laranja de acridina diluída em tampão Sorenson em pH 6.8. Este material foi analisado em microscopia de fluorescência, sob uma ampliação de 100X. Um total de 2.000 hemácias por lâmina foram observadas quanto à presença de micronúcleos e anomalias nucleares, e diferenciadas segundo a concentração de RNA em Eritrócitos Policromáticos (EPC) e Eritrócitos Normocromáticos (ENC), conforme Ueda *et al* (1992), modificada por Çavas *et al* (2005).

#### **2.5 Citometria de fluxo**

A aquisição de dados de distinção entre células necróticas e viáveis foi realizada por uma análise com foco nas características morfológicas, presença de restos celulares e integridade de membrana em um citômetro FACScalibur equipado com um laser íon argônio a 488nm. Para as medidas, um total de 20.000 células foram coletadas de cada tubo de amostra usando programas CellQuest e WinMDI 2.9. Para avaliar a integridade de membrana, utilizou-se 7-amino-actinomicina D (7-AAD) 0,25µg/50µl de sangue, incubado por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro (Schmid *et al*, 1994).

## 2.6 Análise estatística

O teste de Kruskal-Wallis foi usado no ensaio cometa e no teste de micronúcleos píceos para comparar as diferenças entre os controles e as doses utilizadas (5 mg/Kg, 50 mg/Kg e 500mg/Kg). Em caso de significância, os dados foram submetidos ao teste de Dunn. Para a citometria de fluxo, os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) para determinar a significância estatística. O teste de Tukey foi executado quando os efeitos eram significativos. Para todos os testes, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 3. Resultados

Os resultados obtidos a partir do ensaio cometa não demonstraram diferenças significativas entre os CGC e CRG em nenhum dos tecidos estudados. Os ensaios utilizando sangue como tecido-alvo demonstraram um aumento dos danos em comparação com os controles negativos nas doses de 5mg/Kg e 50 mg/Kg. Neste tecido verificou-se um menor índice de danos na dose de 500 mg/Kg ( $p=0,006$  na comparação com a dose de 50 mg/Kg), que não apresentou diferenças estatísticas dos controles (Figura 1A).

Já no tecido hepático (Figura 1B), todas as doses de tratamento (5, 50 e 500 mg/Kg de Sulfato de Alumínio) resultaram em danos maiores do que os encontrados nos controles negativos. Não foram observadas diferenças entre os danos quando comparados os tratamentos entre si. No tecido renal, os danos ao DNA foram semelhantes entre as doses (Figura 1C). Entretanto, todas as doses testadas mostraram-se significativamente diferentes dos controles negativos CRC e CRG. Os resultados adquiridos pela análise dos cometas no cérebro não apresentaram diferenças entre as doses de sulfato de alumínio quando comparadas entre si. Entretanto, os tratamentos resultaram em danos estatisticamente diferentes dos encontrados nos controles negativos (Figura 1D).

Na análise dos resultados obtidos na dose de 5mg/kg de Sulfato de Alumínio, houve diferença entre os tecidos sanguíneo e cerebral, e hepático e cerebral, com  $p=0,004$  e  $p=0,005$ , respectivamente, demonstrando que o tecido cerebral sofreu maiores danos (Figura 2A). Na dose de 50mg/kg, verificou-se diferença significativa entre sangue e rim ( $p=0,005$ ) e rim e cérebro ( $p=0,001$ ), sendo o cérebro o tecido que apresentou os maiores danos, diferentemente do sangue, que apresentou os menores escores (Figura 2B). Na dose de 500 mg/Kg observou-se diferenças entre os escores encontrados no sangue e cérebro ( $p=0,0001$ ), sangue e rim ( $p=0,01$ ) e sangue e fígado ( $p=0,03$ ), como apresentado na figura 2C.

Os micronúcleos e alterações nucleares foram analisadas de acordo com Carrasco *et al*, 1990. As lesões nucleares foram divididas em Micronúcleos, Núcleos em Bolha (Blebbled), Núcleos Lobados (Lobed), Núcleos Vacuolados (Vacuolated) e Núcleos Entalhados (Notched), de acordo com sua morfologia. Tais lesões podem ser agrupadas em combinações MB (micronúcleos e núcleos em bolha), MBLN (micronúcleos, núcleos em bolha, núcleos lobados e núcleos entalhados), VN (núcleos vacuolizados e entalhados) em função do significado das lesões.

Pelo teste de micronúcleos píceos em eritrócitos, a dose de 5mg/Kg gerou combinações MBLN e VN que se mostraram significativamente diferentes da MB ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,01$ , respectivamente) (Figura 3A). Na dose de 50 mg/Kg, a combinação MBLN se mostrou mais freqüente do que as MB ( $p = 0,0001$ ) (Figura 3B). Em 500 mg/Kg, da mesma forma que nos controles negativos de ração padrão (CRC) e ração preparada com ração comercial e gelatina (CRG), a combinação MBLN se mostrou semelhante à VN, e diferente de MB ( $p = 0,001$ ) (Figura 3C).

Quando analisadas entre as diferentes doses, a combinação MB não apresenta diferenças entre as doses. Entretanto, as doses de 5 e 500 mg/Kg geraram freqüências diferentes das observadas nos controles. De forma semelhante, na combinação VN as doses de 5, 50 e 500mg/Kg possuem freqüências iguais entre si e aos controles negativos. A combinação MBLN nas doses de 50 e 500 mg/Kg mostraram-se diferentes da dose de 5 mg/Kg ( $p = 0,003$  e  $p = 0,005$ , respectivamente), mas somente a dose de 50 mg/Kg foi diferente dos controles. As alterações totais encontradas nos diferentes tratamentos tiveram freqüências diferentes das encontradas nos controles apenas na dose de 50 mg/Kg. Estas foram maiores nas doses de 50 e 500 mg/Kg ( $p = 0,003$  e  $p = 0,04$ ) do que na dose de 5 mg/Kg. Estes resultados podem ser observados na Tabela 1.

Na tabela 2 podemos verificar as freqüências das lesões nucleares de forma individualizada. Apenas os núcleos lobulados tiveram uma freqüência maior na dose de 50 mg/Kg quando comparada com a freqüência dos controles, enquanto as demais (núcleos entalhados, em bolha e vacuolizados) se mostraram semelhantes entre os tratamentos e controles.

A freqüência de eritrócitos policromáticos em relação ao número de eritrócitos totais (%EPC), descrita na Figura 4, não foi se mostrou diferente entre os grupos tratados nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg e os controles negativos.

Os resultados para o teste de viabilidade celular com 7-AAD não demonstraram diferenças na viabilidade das células tratadas com sulfato de alumínio e o controle negativo (figura 5).

#### 4. Discussão

Diversos autores consideram que o Alumínio é tóxico para as brânquias, com mecanismos que envolvem a regulação iônica e a respiração, ou uma mistura de ambos. Segundo Poston, 1991 e Handy, 1993, o alumínio na dieta não tem efeitos significativos, nem adversos nem benéficos. Entretanto, os resultados obtidos pelo ensaio cometa no presente trabalho indicam um aumento da genotoxicidade após a administração subcrônica via trófica deste metal em fígado, rim, cérebro e sangue. Estes resultados, no entanto, não apresentaram uma relação dose-resposta. Todos os tecidos das três doses testadas (5, 50 e 500 mg/Kg) obtiveram um aumento no dano do DNA significativamente diferente do observado nos controles negativos. Mas, de uma forma geral, as doses não apresentaram diferenças de danos entre si.

Este tipo de resultado foi obtido anteriormente por outros trabalhos com o ensaio cometa. Ramsdorf *et al*, em 2009, fizeram a avaliação genotóxica de diferentes doses de chumbo inorgânico na espécie *Hoplias malabaricus*, com tratamento por injeção intraperitoneal no tempo de 96h. Seus resultados, de forma semelhante aos apresentados, demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre as doses e o controle, mas não entre as doses aplicadas. Em 2009, Vicari *et al* também encontraram resultados que diferiram do controle mas não entre si no que se refere a diferentes doses de metilmercurio, testadas via trófica em *Hoplias malabaricus*. Num estudo com o ensaio cometa em minhocas da espécie *Eisenia fétida* com três concentrações de níquel, não foram observadas diferenças significativas entre as doses testadas, apesar de todas levarem a resultados diferentes do controle (REINECKE & REINECKE, 2004).

Isso pode ser explicado pelo fato de que a exposição crônica a poluentes pode levar á acumulação de quebras no DNA, já que a capacidade de reparo do DNA em peixes, um importante mecanismo para proteger a integridade do DNA, é menor se comparado a outras espécies (THEODORAKIS *et al*. 1994). Como a intensidade da cauda indica o número de quebras no DNA, podemos considerar que, após um nível crítico de dano, quando um máximo é atingido, a cauda não vai aumentar em tamanho, apenas em intensidade (BOWDEN *et al*.2003; COLLINS *et al*. 1997).

No que se refere à sensibilidade dos tecidos, em todas as doses o cérebro se mostrou com os maiores danos, em contraste com os menores danos apresentados pelo sangue. Este resultado está de acordo com a literatura que explana sobre os efeitos neurotóxicos do alumínio, em várias formas (YELLAMMA *et al*, 2010; XIAO *et al*, 2011). Portanto, podemos sugerir que o alumínio tenha a tendência a acumular-se em tecidos e não em sangue circulante. Este resultado demonstra a necessidade de se utilizar tecidos diversos em experimentos *in vivo* com o Ensaio Cometa.

O teste de micronúcleos písceos corroborou esta hipótese. Apenas a dose de 50 mg/Kg apresentou lesões nucleares totais significativamente diferentes do controle negativo, bem como da combinação MBLN, causada pela maior frequência de núcleos lobulados.

Segundo Strunjak-Perovic *et al.*, 2009, não há uma padronização e tampouco dados consistentes no que se refere à origem das anormalidades nucleares eritrocíticas. Não há, portanto, uma correlação bem estabelecida entre anormalidades nucleares e genotoxicidade (FERRARO *et al*, 2004).

A genotoxicidade pode ser erroneamente aceita como o mecanismo que causou lesões nucleares, que podem ter tido outras etiologias. Uma das possibilidades é a presença de necrose eritrocítica viral, assim como anemias. Segundo Carrasco *et al*, 1990, um dos problemas com o teste de micronúcleos písceos é desenvolver uma forma de diferenciar lesões nucleares resultantes de mecanismos genotóxicos daquelas geradas por outros mecanismos.

Visando minimizar estes fatores, no presente trabalho foi realizado o ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo, capaz de separar células viáveis de necróticas. O resultado demonstrou que nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg de Sulfato de Alumínio, o tecido sanguíneo continha a mesma quantidade de células viáveis que o controle negativo. Isso sugere que as alterações nucleares encontradas possam ter origem genotóxica.

Lima *et al*, 2007, relatou a citotoxicidade do Alumínio e seu impacto no aparato do fuso mitótico. Além disso, muitos organismos podem inativar mecanismos de morte celular programada em resposta à excessiva acumulação de metais tóxicos (AGNELLO *et al*, 2007; SAMALI & COTTER, 1996). Esperava-se, portanto, um aumento mais significativo no número de alterações nucleares após tratamento subcrônico com sulfato de alumínio. Entretanto, o alumínio é capaz de aumentar o estresse oxidativo em peixes (TERNJEJ *et al*, 2010), e sabe-se que isso pode resultar em danos no DNA e apoptose (KAWANISHI *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2004). De fato, foi demonstrado que o Alumínio não apenas induz apoptose

via danos ao DNA, como interfere na regulação dos próprios fatores apoptóticos (CUI *et al.*, 2003).

Para aumentar a sensibilidade do teste de micronúcleos píceos em eritrócitos, foi utilizada a técnica proposta por Ueda *et al* (1992) de coloração com laranja de acridina, o que permite diferenciar entre eritrócitos normocromáticos (ENC) e policromáticos (EPC). Não houve, entretanto, alterações na percentagem de EPC com os tratamentos com sulfato de alumínio.

Alguns peixes não possuem mecanismos homeostáticos para o controle de concentrações internas de metais tóxicos, o que resulta em letalidade. Mas os efeitos de concentrações subletais de metais em peixes ainda não está plenamente entendido (GABIANELLI *et al.* 2003).

## **5. Conclusão**

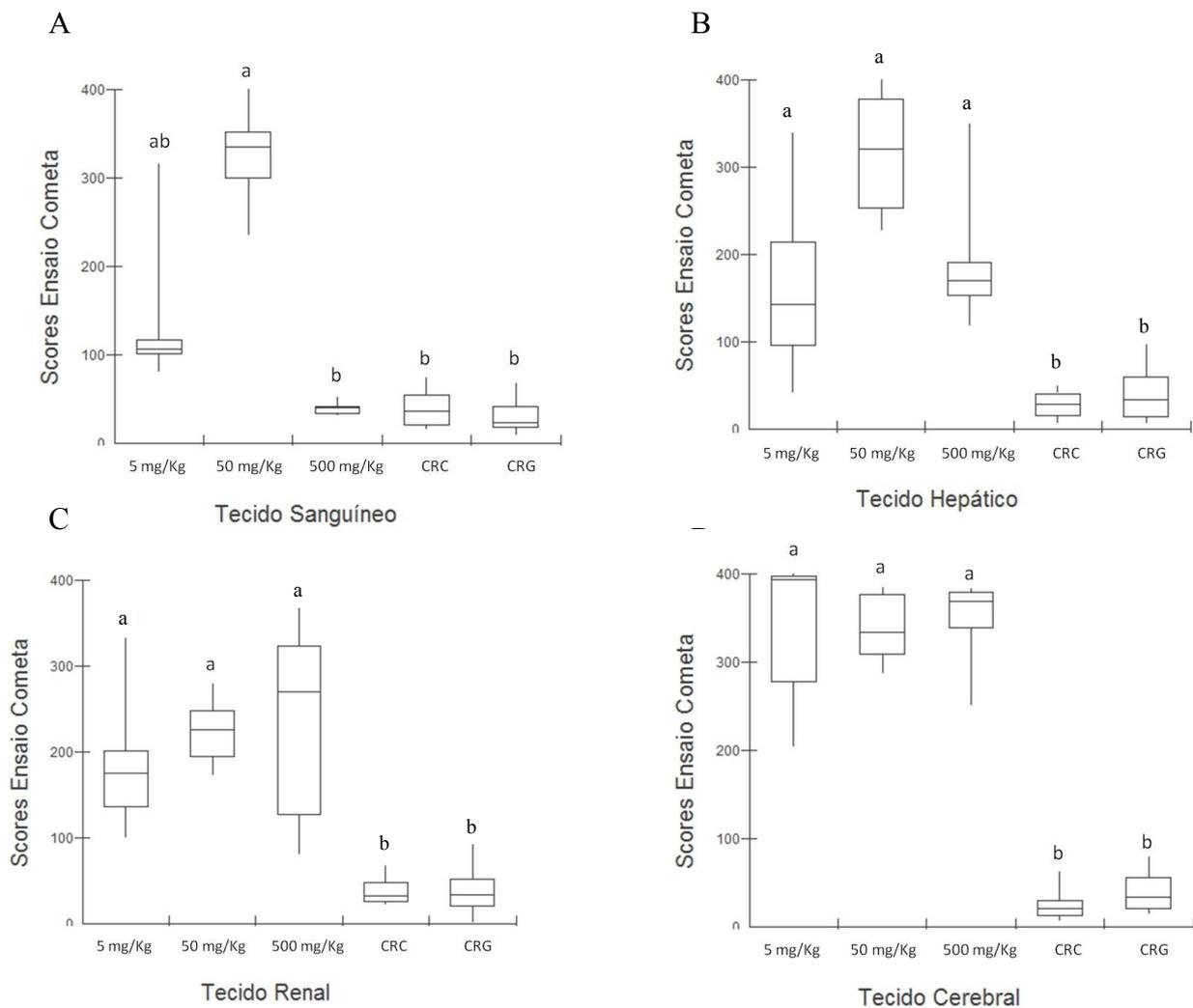
O Sulfato de Alumínio em tratamento subcrônico por 60 dias via trófica em *Rhamdia quelen* nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg induziu quebras no DNA deflagradas pelo ensaio cometa nos tecidos cerebral, sanguíneo, renal e hepático, sendo o cérebro o tecido que apresentou maiores danos ao DNA, demonstrando mais afinidade pelo alumínio ou possível acumulação. Por outro lado, o sangue foi o que apresentou menores escores de danos ao DNA, possivelmente por não possuir condições de acumulação em suas células eritrocitárias. Isto pode ser observado pela baixa frequência de células inviáveis no tecido sanguíneo. O teste de micronúcleos píceos, no entanto, só obteve resultados positivos na dose de 50 mg/Kg, por ser um teste menos sensível do que o ensaio cometa.

## **6. Referências Bibliográficas**

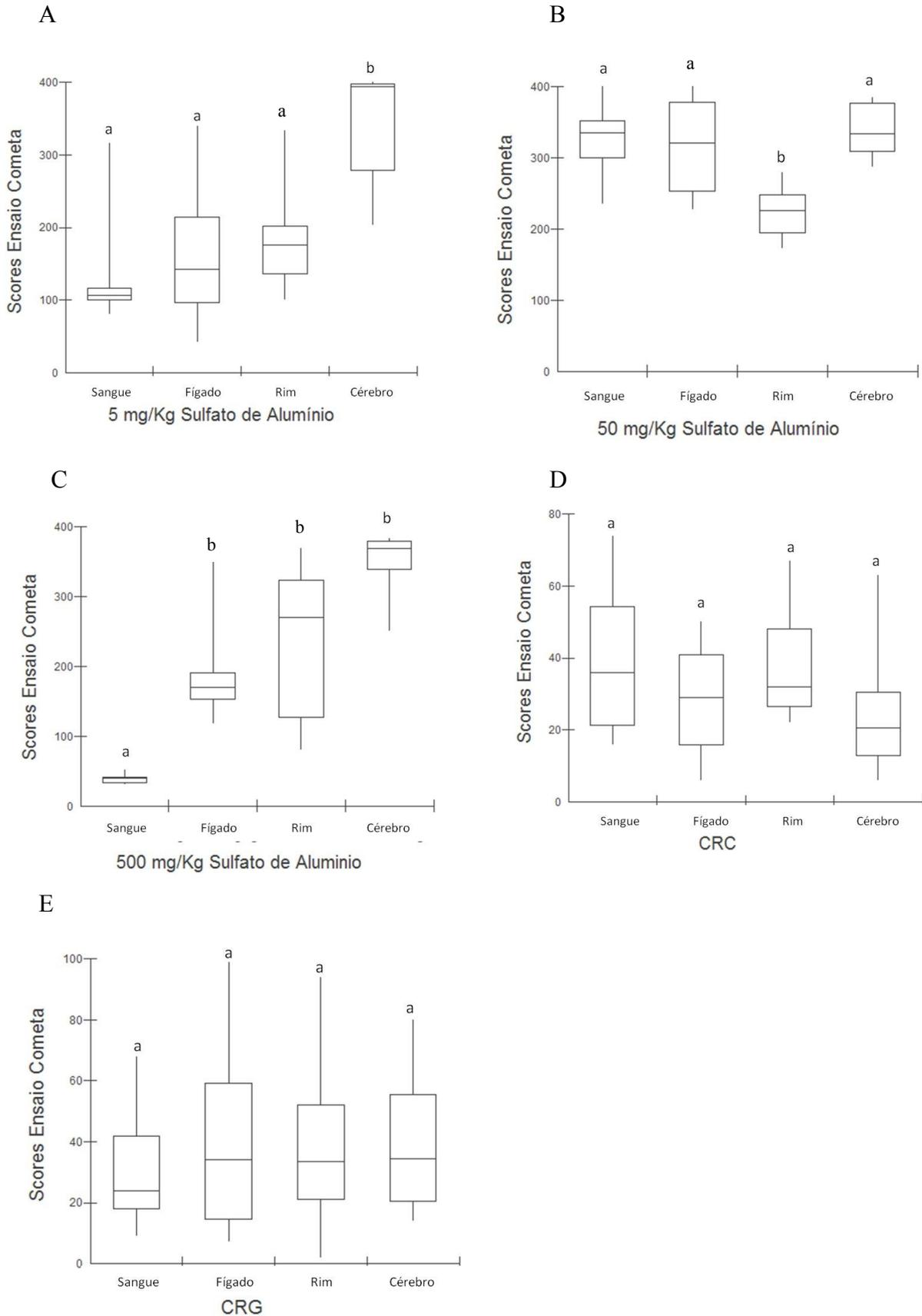
As referências citadas neste artigo estão listadas com as demais, ao final da tese.

## 7. Apêndices

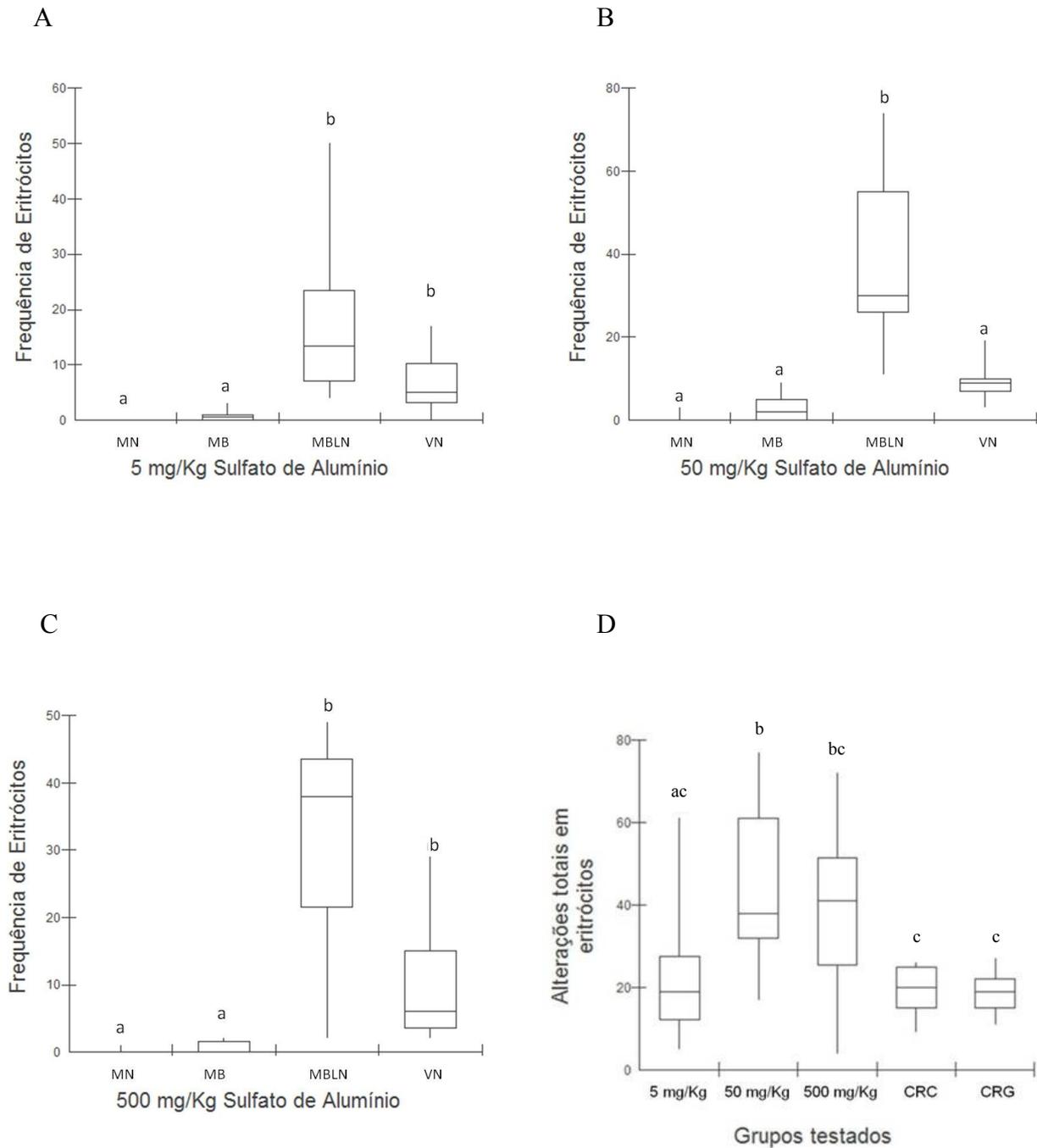
**Figura 1.** Comparação entre os danos observados no Ensaio Cometa referentes aos tecidos sanguíneo (A); hepático (B); renal (C) e cerebral (D): controles e doses de 5, 50 e 500 mg/Kg de Sulfato de Alumínio. As letras indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$



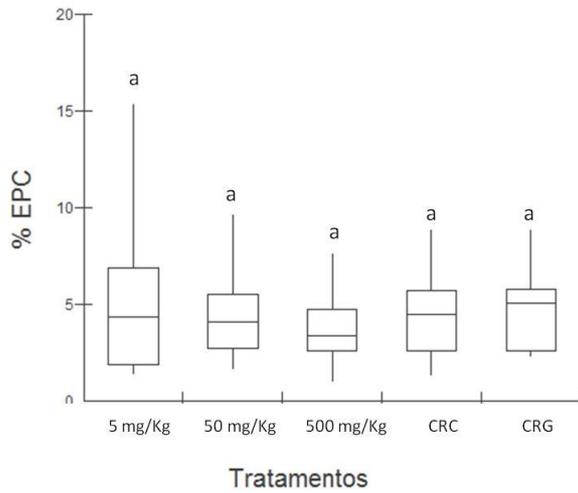
**Figura 2:** Comparação entre os danos observados no Ensaio Cometa referentes aos tecidos sangüíneo, hepático, renal e cerebral nas doses de 5 (A), 50 (B) e 500 (C) mg/Kg de Sulfato de Alumínio. As letras indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .



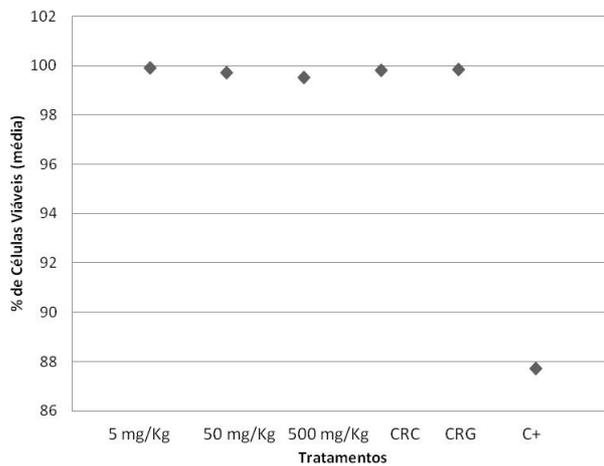
**Figura 3:** Micronúcleos e combinações de lesões nucleares referentes às doses de 5 (A), 50 (B) e 500 (C) mg/Kg de Sulfato de Alumínio, e alterações totais (D). As letras (a, b, c) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .



**Figura 4:** Frequência de Eritrócitos Policromáticos (EPC) relativos aos eritrócitos totais referentes às doses de 5, 50 e 500 mg/Kg de Sulfato de Alumínio e controle negativo com ração comercial padrão. As letras (a, b, c) indicam diferenças e similaridades estatísticas. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .



**Figura 5:** Percentagem de células sanguíneas viáveis como resultado da citometria de fluxo com 7-AAD.



**Tabela 1:** Frequência observada de combinações de lesões nucleares em relação ao total de alterações, e prevalência de alterações totais em relação ao número total de células analisadas. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas entre as doses dentro de cada combinação. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

<b>Combinação de Lesões M-B</b>		
<b>Dose de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub></b>	<b>Mediana ± quartis (25%/75%)</b>	<b>Prevalência (%)*</b>
5 mg/Kg	0.50 <sup>a</sup> ± 0.00/1.00	3.75
50 mg/Kg	2.00 <sup>ab</sup> ± 0.00/5.00	7.38
500 mg/Kg	0.00 <sup>a</sup> ± 0.00/1.50	1.84
CRC	3.00 <sup>b</sup> ± 1.00/3.00	11.36
CRG	2.00 <sup>b</sup> ± 2.00/3.00	12.56

<b>Combinação de Lesões M-B-L-N</b>		
<b>Dose de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub></b>	<b>Mediana ± quartis (25%/75%)</b>	<b>Prevalência (%)*</b>
5 mg/Kg	13.50 <sup>ac</sup> ± 7.00/23.50	79.18
50 mg/Kg	30.00 <sup>b</sup> ± 26.00/55.00	86.01
500 mg/Kg	38.00 <sup>bc</sup> ± 21.50/43.50	80.81
CRC	15.00 <sup>c</sup> ± 10.00/20.00	76.14
CRG	14.00 <sup>c</sup> ± 11.00/16.00	75.30

<b>Combinação de Lesões V-N</b>		
<b>Dose de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub></b>	<b>Mediana ± quartis (25%/75%)</b>	<b>Prevalência (%)*</b>
5 mg/Kg	5.00 <sup>a</sup> ± 3.25/10.25	11.60
50 mg/Kg	9.00 <sup>a</sup> ± 7.00/10.00	8.14
500 mg/Kg	6.00 <sup>a</sup> ± 3.50/15.00	11.07
CRC	9.00 <sup>a</sup> ± 7.00/12.00	46.02
CRG	11.00 <sup>a</sup> ± 10.00/12.00	49.13

<b>Alterações Totais</b>		
<b>Dose de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub></b>	<b>Mediana ± quartis (25%/75%)</b>	<b>Prevalência (%)**</b>
5 mg/Kg	19.00 <sup>ac</sup> ± 12.25/27.50	2.61
50 mg/Kg	38.00 <sup>b</sup> ± 32.00/61.00	5.53
500 mg/Kg	41.00 <sup>bc</sup> ± 25.50/51.50	4.84
CRC	20.00 <sup>c</sup> ± 15.00/25.00	2.15
CRG	19.00 <sup>c</sup> ± 15.00/22.00	3.10

\* Frequência sobre o total de alterações

\*\* Frequência sobre o total de células

Tabela 2: Frequência observada de micronúcleos e lesões nucleares em relação ao total de alterações. As letras (a, b) indicam diferenças e similaridades estatísticas entre as doses dentro de cada tipo de lesão. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

	Micronúcleos	Núcleo Entalhado	Núcleo em Bolha	Núcleo Lobulado	Núcleo Vacuolizado
5 mg/Kg	0.00 <sup>a</sup>	7.85 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>	67.58 <sup>a</sup>	18.78 <sup>a</sup>
50 mg/Kg	1.27 <sup>a</sup>	2.04 <sup>a</sup>	6.11 <sup>a</sup>	76.60 <sup>b</sup>	12.98 <sup>a</sup>
500 mg/Kg	0.37 <sup>a</sup>	9.60 <sup>a</sup>	1.48 <sup>a</sup>	69.37 <sup>ab</sup>	16.24 <sup>a</sup>
CRC	1.14 <sup>a</sup>	13.07 <sup>a</sup>	10.23 <sup>a</sup>	51.70 <sup>a</sup>	22.73 <sup>a</sup>
CRG	0.58 <sup>a</sup>	14.45 <sup>a</sup>	9.76 <sup>a</sup>	50.29 <sup>a</sup>	24.92 <sup>a</sup>

## Capítulo III

**Adaptação da metodologia Cometa-FISH para tecidos  
de *Rhamdia quelen* (Siluriforme).**

**Adaptação da metodologia Cometa-FISH para tecidos de**

## ***Rhamdia quelen* (Siluriforme).**

Paula Moiana da Costa <sup>a\*</sup>, Marcelo Ricardo Vicari <sup>b</sup>, Marta Margarete Cestari <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Genética, Laboratório de Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brasil

\* Corresponding author at: Dpto. Genética, Setor de Ciências Biológicas, Jardim das Américas, UFPR, Centro

Politécnico, Caixa Postal: 19071, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 3361 1727; fax: +55 41 3361 1793.

E-mail address: pmoicosta@gmail.com (Paula Moiana da Costa)

### **Resumo**

Na atualidade, é de grande importância conhecimentos sobre as respostas biológicas da extensa variedade de compostos químicos que são incorporados aos ecossistemas aquáticos. O peixe jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa, bem adaptada a diferentes ambientes e amplamente utilizada em viveiros de piscicultura, o que o torna um modelo biológico adequado para este tipo de estudo ecotoxicológico. No intuito de estudar os efeitos de xenobióticos no DNA, tem sido desenvolvido um número expressivo de sistemas testes. O Ensaio Cometa é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA que pode ser conduzido em qualquer tecido dos quais células ou núcleos individualizados possam ser preparados. Este ensaio vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Entretanto, o ensaio cometa fornece informações apenas ao nível de dano geral ao DNA. Assim, sua combinação com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) pode ser uma ferramenta interessante por permitir a alocação da sequência examinada na região danificada ou intacta do cometa, fornecendo informações adicionais sobre sequências ou regiões específicas do genoma. Desde seu desenvolvimento inicial, o Cometa-FISH tem sido usado para tratar de diferentes questões. Embora seja uma ferramenta promissora dentro da ecotoxicologia, não foram ainda desenvolvidos trabalhos neste campo, tampouco utilizando peixes como modelo biológico. Portanto, a presente proposta consiste em adaptar e aplicar a técnica de Cometa – FISH nos nucleóides de células de jundiás.

## 1. Introdução

Peixes têm demonstrado serem sensíveis a pequenos níveis de contaminantes no meio aquático, além de receberem exposição dermal em função de sua imersão total na solução de exposição também se expõem através da respiração e alimentação (WERDOK *et al.*, 1971).

Um elevado nível de conservação dos programas genéticos de controle do desenvolvimento e de processos fisiológicos fundamentais está presente entre todos os vertebrados, bem como entre invertebrados e vertebrados. O sistema endócrino, por exemplo, é altamente conservado entre peixes e outros vertebrados. Peixes possuem a maioria dos tipos de tecidos de mamíferos, exceto mama, próstata e pulmão. Peixes têm servido como sentinelas úteis para detectar os riscos ambientais, bem como eficientes e rentáveis modelos para mecanismos toxicológicos e avaliação de riscos ao longo de várias décadas (HARSHBARGER, 1990).

A maior parte dos estudos regulatórios, estabelecidos para estimar o risco no uso de um produto químico ou no acesso à qualidade de um ambiente, está baseada em diversas metodologias utilizadas na ecotoxicologia (BARTELL *et al.*, 1992). Entretanto, a complexidade de mecanismos envolvidos na ecotoxicologia, e a amplitude e diversidade do campo de investigação levam à crucial necessidade de novas metodologias de pesquisa (BOUDOU e RIBEYRE, 1997).

Pelos motivos descritos acima, a espécie *Rhamdia quelen* (jundiá), cujo cultivo vem crescendo progressivamente no Brasil, está sendo utilizada em diversos experimentos toxicológicos (FERRARO, 2009; GHISI *et al.*, 2011; PAMPLONA *et al.*, 2011; PIANCINI, 2011), principalmente por ser nativa, bem adaptada a diferentes ambientes e amplamente utilizada em viveiros de piscicultura (GOMES *et al.*, 2000).

O Ensaio Cometa, também conhecido por SCGE (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA que pode ser conduzido em qualquer tecido dos quais células ou núcleos individualizados possam ser preparados. Para a detecção de quebras de fita simples, lise alcalina e condições eletroforéticas especiais (pH>13) são recomendadas, no intuito de facilitar o desenovelamento da dupla fita de DNA e a expressão dos sítios álcil lábeis (RIBEIRO & ANDRADE, 2003).

Este ensaio vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O teste do cometa não é usado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas

que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o teste do cometa também pode ser utilizado para estudos do reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo. Uma vez que danos no DNA são freqüentemente célula e tecido - específicos, uma metodologia como o teste do cometa, que permite a detecção de danos e seu reparo em uma célula e, conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema importância para a avaliação de compostos genotóxicos (BELPAEME, COOREMAN & KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Há, entretanto, algumas desvantagens inerentes a este ensaio, como a incapacidade em medir o tamanho dos fragmentos entre lesões, o número de lesões e o local destas. Embora alguns tratamentos induzam uma grande variedade de lesões, que podem variar enormemente em toxicidade (SPIVAK, 2010), o ensaio cometa fornece informações apenas ao nível de dano geral ao DNA. Assim, sua combinação com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) pode ser uma ferramenta interessante por permitir a alocação da sequência examinada na região danificada ou intacta do cometa, fornecendo informações adicionais sobre sequências ou regiões específicas do genoma (RAPP *et al*, 2005).

Santos, Singh & Natarajan, em 1997, foram os primeiros a descrever o método que combina o teste do Cometa com o FISH. A técnica Cometa-FISH é uma ferramenta útil para detectar danos e reparo gerais e em regiões específicas do DNA. Enquanto o teste Cometa permite separar o DNA fragmentado do não fragmentado, o FISH auxilia a detectar sequências específicas de DNA de interesse, incluindo cromossomos inteiros (LIEHR *et al*, 2004).

Em contraste com outros métodos onde a hibridização é realizada com o DNA fixo em substratos sólidos, em todos os protocolos Cometa-FISH o DNA das células lisadas foi mantido embutido em agarose através dos passos do FISH. Deste modo, a configuração tridimensional das regiões hibridizadas puderam ser facilmente observadas em cada célula via microscopia de epifluorescência (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008).

A combinação das duas técnicas tem, portanto, sido utilizada no estudo da distribuição dos danos e reparo do DNA em todo o genoma (HORVATHOVA *et al.*, 2004) e na detecção de modificações de sequências no DNA de células individuais (SANTOS, SINGH & NATARAJAN, 1997).

Desde seu desenvolvimento inicial, o Cometa-FISH tem sido usado para tratar diferentes questões (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008). Primeiro, ele foi

usado para identificar áreas específicas do cromossomo nas fibras do DNA e para determinar sua distribuição espacial (SANTOS, SINGH & NATARAJAN, 1997). Outras aplicações foram então detectar atividades de reparo de regiões específicas (HORVATHOVA *et al.*, 2004; MCKENNA *et al.*, 2003; MELLON *et al.*, 1986), efeitos genotóxicos no DNA total e nos telômeros (ARUTYUNYAN *et al.*, 2005), ou em genes tumorais relevantes, como o TP53 (SCHAEFERHENRICH *et al.*, 2003), além de alterações cromossomais específicas (HARREUS *et al.*, 2004), assim como instabilidade genética (TIRUKALIKUNDRAM, KUMARAVEL & BRISTOW, 2005). O Cometa-FISH também tem sido usado para distinguir quebras na fita única ou dupla do DNA (FERNANDEZ *et al.*, 2001).

A análise comparativa de danos ao DNA pelo teste Cometa e pelo FISH nas mesmas amostras foi realizada em células sanguíneas humanas, tratadas com doxorubicina (ANDERSON, YU & BROWNE, 1997), linfócitos periféricos humanos e células pulmonares de Hamster Chinês tratados com metil metanosulfonato, ciclofosfamida e novos medicamentos (GIANNOTTI *et al.*, 2002; MONTEITH & VANSTONE, 1995), demonstrando alta correspondência de resultados, e aperfeiçoando, assim, a interpretação dos resultados (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008).

O Cometa-FISH usando sondas telômero-específicas de ácido nucléico peptídico (PNA) foi aplicado para a detecção de seqüências teloméricas no DNA danificado de células tratadas com bleomicina citostática (BLM), mitomicina C (MMS) e cisplatina (ARUTYUNYAN *et al.*, 2004 e 2005). Telômeros localizados fora do núcleo foram considerados como danificados. O nível de fragilidade telomérica foi mensurado em leucócitos humanos normais para prever efeitos não controlados de drogas em telômeros em tecidos não cancerosos de pacientes tratados. Os níveis comparativos de danos teloméricos e no DNA como um todo foram avaliados também em linhagens celulares de tumores (HOVHANNISYAN *et al.*, 2005).

Adicionalmente, neste estudo, a técnica Cometa-FISH foi capaz de revelar a maior fragilidade dos telômeros comparado ao DNA total em leucócitos humanos não tratados (ARUTYUNYAN *et al.*, 2005). Estes resultados refletem as descobertas de Santos, Singh & Natarajan, em 1997, reveladas pela investigação da ultraestrutura nuclear com FISH em cometas, que mostraram que telômeros estão concentrados principalmente próximos à membrana nuclear. A mesma localização espacial dos telômeros dá a eles uma maior chance de migração do núcleo após a indução de danos ao DNA (GLEI, HOVHANNISYAN & POOL-ZOBEL, 2008).

A tabela 1(anexo) mostra os trabalhos já realizados a partir desta técnica.

Apesar de ser uma ferramenta extremamente promissora, e de ser utilizado para responder as mais diferentes questões, relativamente poucos trabalhos empregaram o Cometa – FISH. Em sua extensiva maioria, os estudos se referem a dano e reparo de genes tumorais e instabilidade genética em células humanas e a determinação da configuração espacial de sequências na estrutura do cometa. Não há relatos de estudos relacionados á ecotoxicologia, e tampouco utilizando peixes como modelo biológico. Além disso, as metodologias descritas na literatura que são em sua maioria com cultura de linfócitos humanos, não propiciaram resultados satisfatórios *in vivo*.

Considerando, portanto, a relevância das informações que a técnica do Cometa-FISH pode trazer para os estudos ecotoxicológicos, e a possibilidade de obtermos resultados relevantes para a pesquisa com animais endêmicos, propusemos no presente trabalho a adaptação deste ensaio para a sua utilização em peixes como modelo biológico. Para tal, hibridizamos nucleóides de células renais, hepáticas, cerebrais e eritrócitos de *Rhamdia quelen* com sonda telomérica.

## 2. Materiais

### **\*Solução de Hibridação (estringência 77%) sonda única**

- 200 µl Formamida (50% de Formamida);
- 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%);
- 40 µl de 20xSSC (conc final 2xSSC);
- 80 µl de H<sub>2</sub>O qsp. Acrescentada 420 ng de sonda seca.
- Volume final 400 µl.

### **\* Solução formamida 15%/0,2xSSC**

- 30 mL de formamida
- 20 mL de 2xSSC
- 150 mL de H<sub>2</sub>O dest.

### **\* Solução de Tween 0,5%/4xSSC**

- 200 mL de 20xSSC
- 5 mL solução estoque Tween 10%; ou 500 µl Tween puro
- completar para 1L de H<sub>2</sub>O

**\*PBS-10x**

- 75,8g de NaCl (1,36M)
- 9,93 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (70mM) ou
- 12,45g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O
- 4,14g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (30mM)
- H<sub>2</sub>O q.s.p. 1000ml e autoclavar

**\*20xSSC**

- 175,6 g NaCl
- 88,2 g de Citrato de sódio
- dissolver em 1L de água destilada, autoclavar.

**\*Sulfato dextrano 50%**

- 0,5 g de sulfato dextrano
- 1 mL de água destilada

**\*FITC**

- solução uso (diluído em água destilada);
- 250 ηg/100μL

**\*Antifading**

- 50 mg de 1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid (Fluka 78460);
- dissolver em 5 mL de tampão PBS 1X;
- elevar o pH até 8 do antifading com bicarbonato de sódio pH=9,0;
- completar para o volume de 50 mL com glicerol Merck.
- Filtrar com papel filtro (papel 0,45), envolver com papel alumínio, guardar no freezer.

**\*Antifading + DAPI**

- diluir 1μL de DAPI 0,2 mg/mL em 1 mL de antifading;

**\*Bicarbonato De Sódio pH 9,0**

- 0,42 g de bicarbonato de sódio
- 10 mL de H<sub>2</sub>O dest.;

- acertar o pH com NaOH.

**\*DAPI 0,2 mg/mL (solução estoque 100x)**

- dissolva 2mg de DAPI em 10 mL de H<sub>2</sub>O dest.;

**\*DAPI 2 µg/mL (solução uso)**

- dissolva 100 µL da solução estoque em 10 mL de tampão McIlvaine pH 7,0.

**\*NaCl 5M**

- 29,22 g de NaCl
- 100 mL de água bidestilada
- filtrar a vácuo e autoclavar

**\*NaOH 0.5M**

- 2g NaOH
- 100 mL de água destilada

**\*Tris HCl 1M**

- trizma base 121,14 g
- H<sub>2</sub>O 500 mL
- HCl até pH desejado
- H<sub>2</sub>O até completar 1000 mL
- Filtrar a vácuo e autoclavar

**\*EDTA 0,5 M**

- 18,61 g de EDTA
- 100 mL de água bidestilada
- acertar o pH com pastilhas de NaOH. O EDTA só irá dissolver a medida que o pH for ajustado

**\*TE**

- 750 µL Tris HCl 2M
- 350 µL de EDTA 0,5 M
- 150 mL de água bidestilada

### 3. Procedimentos

#### Cometa

##### Preparação das lâminas

A preparação das lâminas para o Comet-FISH deve ser diferente do método convencional para o cometa, em função do maior stress mecânico que sofrerão.

Primeiramente, as lâminas de vidro a serem utilizadas foram lixadas com o auxílio de uma furadeira e lixa, de modo a gerar uma superfície irregular e otimizar a adesão da agarose.

A agarose para a camada-base foi preparada com 0,5% de agarose de Ponto de Fusão Normal (NMP) em Tampão Fosfato-Salina (PBS). Mantendo-a a uma temperatura média de cerca de 80°C em banho-maria, 100 µl foram pipetados em uma lâmina. Imediatamente esta agarose foi espalhada com o auxílio de uma lamínula de vidro de 24 x 32 mm, percorrendo toda a sua extensão. Estas lâminas foram secas *overnight*, ao ar livre.

No dia anterior à execução do teste, estas lâminas foram cobertas com uma segunda camada de agarose NMP a 1% em PBS.

Esta agarose, após o seu preparo, foi armazenada em alíquotas de 1 ml em *eppendorf*, em freezer. Isso evita que ela seja exposta a temperaturas altas diversas vezes, quando for utilizada em testes posteriores, e mantenha a sua umidade original.

A agarose NMP 1%, no momento do uso, foi fervida a 50°C e mantida a esta temperatura em banho-maria. Em seguida, pipetou-se 400µl, os quais foram distribuídos longitudinalmente nas lâminas pré-cobertas e rapidamente cobertos com lamínula de vidro de 24 x 32 mm.

Imediatamente após a segunda cobertura, as lâminas foram dispostas horizontalmente em bandejas de alumínio previamente geladas no freezer. Isto evita que a camada-base derreta com a temperatura da segunda camada, misturando-se.

Após a solidificação da segunda camada, as lâminas foram armazenadas no freezer em um recipiente escuro e fechado, com algodão umedecido. Deve-se tomar o cuidado de evitar temperaturas muito baixas, que provocam rachaduras na agarose.

##### Ensaio Cometa para o Comet-FISH

As lamínulas das lâminas previamente preparadas foram cuidadosamente removidas. Estas lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por alguns minutos antes do uso, até que alcançassem esta mesma temperatura. A camada média não pode estar gelada, pois isso levará a uma distribuição desigual da camada superior de agarose, por uma gelificação prematura. Pode-

se aquecer estas lâminas a 40°C em estufa, mas deve-se tomar o cuidado de não ressecar a camada média, pois isso levará a uma não adesão da camada superior.

A agarose utilizada para a camada superior foi a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 1% em água. No momento do uso, esta agarose foi derretida e mantida a 40°C em banho-maria.

Após a extração dos tecidos e homogeneização destes em PBS, 1 volume da suspensão celular foi adicionada à 4 volumes da agarose LMP, e homogeneizadas com a própria pipeta. A suspensão celular deve ser previamente aquecida ou colocada em banho-maria a 40°C por alguns segundos após a mistura, de modo a não abaixar a temperatura da agarose.

Rapidamente, 100µl da suspensão celular + LMP foram pipetados e dispostos longitudinalmente na lâmina previamente coberta. Imediatamente, a lâmina foi coberta com lamínula de vidro de 24 x 32 mm e disposta em uma bandeja de alumínio previamente gelada.

Após cerca de 5 minutos, as lamínulas foram removidas.

As lâminas, então, foram colocadas em solução de lise previamente gelada por 48 horas, mantidas em refrigerador.

A eletroforese subsequente foi feita com tampão alcalino, a 25V e 300 mA por 25 minutos, com a cuba imersa em gelo. As lâminas foram neutralizadas em três sessões de 5 minutos, e após secas, fixadas com etanol por 5 minutos.

### 3.1 Comet-Fish

#### Amplificação de sequências teloméricas por PCR

Reagentes	Quantidades
<b>Tampão da enzima</b>	<b>5,0 µl</b>
<i>dATP</i>	<i>1,0 µl</i>
<b>dCTP</b>	<b>1,0 µl</b>
<i>dGTP</i>	<i>1,0 µl</i>
<b>dTTP</b>	<b>0,7 µl (7: 3 com a digoxi)</b>
<i>Digoxigenina 11 dUTP</i>	<i>0,6 µl</i>
<b>Primer F</b>	<b>0,2 µl</b>
<i>Primer R</i>	<i>0,2 µl</i>
<b>MgCL<sub>2</sub></b>	<b>2,5 µl</b>
<i>dH<sub>2</sub>O</i>	<i>37,4 µl</i>
<b>Taq pol</b>	<b>0,4 µl</b>
Total	50 µl

### Parâmetros para amplificação DOP-PCR

- 1 – 5 min 94°C
- 2 – 1 min 94 °C
- 3 – 30s 55 °C
- 4 – 1 min 72 °C
- 5 – voltar ao passo 2 por 10 vezes
- 6 – 1 min 94°C
- 7 – 30s 60°C
- 8 – 90s 72°C
- 9 – voltar ao passo 6 por 30 vezes
- 10 – 5 min 72°C
- 11 - Hold 4°C

#### Pré-hibridação

As lâminas foram colocadas por 5 - 7 dias em etanol absoluto a 4°C. Então foram brevemente secas, sem deixar a agarose secar totalmente, e colocadas em água destilada por 10 minutos.

As células foram, em seguida, desnaturadas em 0.5M NaOH por 25 minutos e desidratadas em séries de etanol de 5 min cada, a 70%, 85% e álcool absoluto, todos a -20°C, e secar ao ar livre. Simultaneamente a desidratação em série alcoólica, a solução de hibridação foi desnaturada a 100°C por um período de 10 min e passada imediatamente ao gelo.

#### Hibridação

Para a hibridação, preparou-se a câmara úmida a 37°C; cada lâmina montada com 50µl de solução de hibridação e cobertas com lamínula, e deixadas overnight a 37°C.

#### Lavagens – Segundo dia

As lâminas foram lavadas em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 10min. Em seguida, lavadas em 4xSSC + 0.5% Tween<sub>10</sub> gelado por 5 minutos.

#### Bloqueio

As lâminas foram incubadas em PBS contendo 1% soro bovino albumina (BSA) por 15 minutos á temperatura ambiente. Em seguida, lavadas por três vezes durante 5min com Tween 0,5%/4xSSC, à temperatura ambiente.

### **Deteccão de sondas marcadas com digoxigenina**

As lâminas foram incubadas com 100 µl de anti-digoxigenina rodamina conjugada (4µl Anti digoxi rodamina/796 µl NFDm) durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente. A diluição do anticorpo (anti-digoxigenina rodamina conjugada) foi de 5:1000.

As lâminas foram então lavadas por três vezes durante 5 minutos cada com Tween 0,5%/4xSSC, á temperatura ambiente, desidratadas em álcool 70, 85 e 100%, durante 5 minutos cada, e secas á temperatura ambiente.

### **Montagem das lâminas com DAPI**

De uma solução de 400 µl de antifading mais 1 µl de dapi (0,2 mg/mL), foram colocadas 40µl da mistura em cada lâmina e coberta com lamínula.

### **Análise das lâminas**

Devem ser analisadas 50 cometas por lâmina, quanto á localização na cabeça ou cauda dos sinais teloméricos.

## **4 Resultados Esperados**

Na atualidade, há uma necessidade premente de se agregar ferramentas mais poderosas ao estudo da ecotoxicologia. A apreensão dos mecanismos e sítios preferenciais de ação de xenobióticos são informações essenciais para a compreensão dos reais riscos toxicológicos, bem como para a delimitação de políticas efetivas no sentido de evitar a exposição e disseminação imponderada destes agentes.

Dentro da genética toxicológica, o teste Cometa tem sido extensivamente empregado. Trata-se de um ensaio sensível, passível de ser utilizado em bioensaios e em pesquisas de campo e que fornece um bom indicativo de genotoxicidade em quaisquer células individualizadas. Entretanto, este teste oferece apenas uma visão geral das quebras no DNA ocasionados por determinado agente, não fornecendo quaisquer dados a respeito da especificidade destes danos. Sabe-se, porém, que determinadas formas e localizações de danos ao DNA induzem a respostas toxicológicas diferentes, e que alguns xenobióticos têm ação preferencial sobre locais específicos do genoma.

Com o intuito de resolver esta lacuna existente no ensaio Cometa, Santos, Singh & Natarajan, em 1997, desenvolveram a técnica do Cometa-FISH, que se trata da união das técnicas do ensaio Cometa com a Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH). Hibridizando sequências específicas nos cometas, esta técnica tornou possível a visualização dos locais preferenciais de quebras no DNA, assim como a detecção de quebras em pontos determinados (figura 1- anexos).

## **5 Referências**

As referências citadas neste artigo estão listadas com as demais, ao final da tese.

## **6 Informações Complementares**

A adaptação da técnica do Cometa-FISH para nucleóides de *Rhamdia quelen* foi parcialmente desenvolvido. Entretanto, seu índice de sucesso corresponde a cerca de 20% das lâminas hibridizadas, o que exige um aperfeiçoamento da técnica para que esta seja efetivamente utilizada.

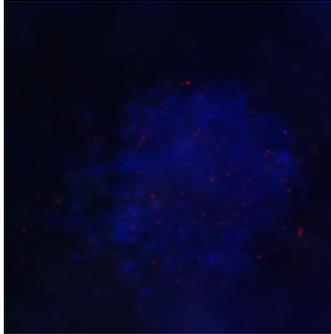
As dificuldades técnicas encontradas referem-se principalmente à preservação do gel de agarose e do material biológico inserido neste gel durante os banhos com formamida. A alternativa mais óbvia para a manutenção do nível de estringência da hibridização seria a utilização de temperatura. Entretanto, por se tratar de lâminas cobertas por agarose, esta opção não pode ser aplicada. As lavagens com Tween e a desidratação com etanol também são procedimentos suspeitos como co-responsáveis pela dificuldade nesta preservação da estrutura do gel. Além de sanar as dificuldades técnicas, seria também de grande interesse o barateamento e a otimização do tempo despendido para a realização da técnica. Assim, a substituição do BSA por outro bloqueador de menor custo, bem como a determinação do menor tempo necessário para a hibridização e para os banhos são fatores a serem testados.

Estas variações na metodologia são de grande importância para a pesquisa no Brasil.

## 7. Anexos

Figura 1: Hibridização de sonda telomérica marcada com digoxigenina em cometas de células renais de *Rhamdia quelen* coradas com DAPI, após contaminação subcrônica por 60 dias com sulfato de cobre na dose de 50mg/Kg.

a.



b.

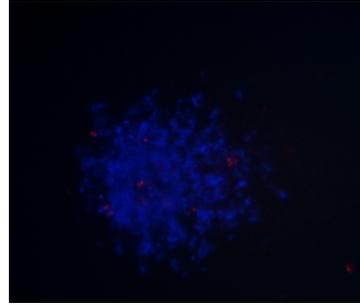


Tabela 1: Estado da arte da técnica Comet-FISH.

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Tecido-alvo</b>	<b>Modelo Biológico</b>	<b>Sonda</b>	<b>Objetivos</b>
Santos, Singh & Natarajan	1997	Linfócitos	Humanos	Centrômeros, telômeros, centrômero cromossomo 7-específico, telômero do 3q, gene da O <sup>6</sup> -metilguanina – DNA - transferase	Desenvolvimento da técnica; organização estrutural da cromatina
McKelvey-Martin <i>et al</i>	1998	Linhagens HT1376, UMUC-3 e RT112 de carcinoma de bexiga	Humanos	Gene P53	Dano e reparo após irradiação com raios X.
Bock <i>et al</i>	1999	Linfócitos	Humanos	Genes p53, p58 e c-Myc; centrômeros e telômeros	Danos após irradiação com UV-A
Rapp <i>et al</i>	2000	Linfócitos	Humanos	Cromossomos 1, 2, 3, 8, 9, 11, 14, 18, 19, 21, X e Y totais	Distribuição dos danos ao DNA induzidos por radiação UV-A
Menke, Meister & Schubert	2000	Raiz	<i>Vicia Faba</i>	Elementos de repetição em tandem <i>FokI</i>	Efeitos genotóxicos do N-metil-N- nitrosurea (MNU)
McKenna <i>et al</i>	2003	Linhagens RT4 e RT112 de câncer de bexiga	Humanos	TP53	Quebra e reparo após irradiação $\gamma$
McKenna <i>et al</i>	2003	Linhagem RT4 de câncer de bexiga	Humanos	TP53	Reparo de danos causados pela Mitomicina C (MMC)
Schaeferhenrich <i>et al</i>	2003	Linhagem LT97 de adenoma de cólon	Humanos	TP53	Efeitos genotóxicos do 4-hidroxi-2-nonenal (HNE)
Schaeferhenrich <i>et al</i>	2003	Células de cólon	Humanos	TP53	Dano e reparo após tratamento com trans-2-hexenal e peróxido de hidrogênio
Arutyunyan <i>et al</i>	2004	Células de sangue periférico	Humanos	PNA telômero-específicas diretamente marcadas	Efeitos da bleomicina e mitomicina C no encurtamento dos telômeros de tecidos não-cancerosos
Harréus <i>et al</i>	2004	Células da mucosa orofaríngea com e sem carcinoma	Humanos	Sondas cromossômicas totais dos cromossomos 1, 3, 5 e 8.	Diferenças na sensibilidade à indução por BPDE de danos no DNA e alterações nos cromossomos 1, 3, 5 e 8
Horváthová <i>et al</i>	2004	Ovário (CHO) Linfócitos	Hamster Chinês Humanos	Genes DHFR, MGMT p53	Quebras e cinética de reparo após dano oxidativo com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Arutyunyan <i>et al</i>	2005	Células de sangue periférico	Humanos	PNA telômero-específicas	Comparação de danos causados pela cisplatina e bleomicina.
Hovhannisyán <i>et al</i>	2005	Linhagens celulares transformadas HT1080 e CCRF-CEM de leucócitos Ovário (CHO)	Humanos Hamster Chinês	Sondas teloméricas PNA	Danos ao DNA após tratamento com bleomicina (BLM) ou mitomicina C (MMC)
Kumaravel & Bristow	2005	Linhagens MCF-7; MDA-MB-468 e CRL-2336 de câncer de mama	Humanos	P53 e HER-2/neu	Instabilidade genética e reparo
Amendola <i>et al</i>	2006	Células do sangue periférico	Camundongos C57BL/6 e CBA/J	Genes Ret, Abl1 (cAbl), e Trp53	Danos ao DNA causados por radiação ionizante

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Tecido-alvo</b>	<b>Modelo Biológico</b>	<b>Sonda</b>	<b>Objetivos</b>
Knöbel <i>et al</i>	2006	Linhagem LT97 de adenoma e células de cólon não transformadas	Humanos	TP53	Verificar os efeitos genotóxicos da uranila nitrilotriacetato
Shaposhnikov <i>et al</i>	2006	Células HeLa	Humanos	Sondas “padlock” para sequências Alu e para mtDNA	Comportamento de sequências repetitivas durante o teste Cometa
Escobar <i>et al</i>	2007	Células linfoblastóides TK6	Humanos	Sondas para 5q31 e 11q23	Deteção e comparação de danos a regiões cromossômicas relevantes na leucomogênese.
Glei <i>et al</i>	2007	Linhagem de adenoma de cólon LT97 e Células primárias de cólon	Humanos	APC, KRAS e TP53	Avaliação de danos no DNA causados por produtos de estresse oxidativo relevantes para o câncer de cólon
Knöbel <i>et al</i>	2007	Células de cólon não transformadas e linhagem LT97 de adenoma de cólon	Humanos	TP53	Danos genéticos do Fe-NTA
Park <i>et al</i>	2007	Leucócitos de sangue periférico	Humanos	TP53	Danos globais e específicos ao DNA causados por nitrilotriacetato ferrico (Fe-NTA)
Shaposhnikov <i>et al</i>	2008	Linfócitos Linhagem de osteosarcoma U-O2S	Humanos	Sondas genômicas COT-1	Organização estrutural da cromatina nos cometas
Volpato <i>et al</i>	2008	Linfoblastoma e células tireoidianas fetais	Humanos	RET, CXCL12/SDF1, ABL, MYC, PLA2G2A, p53, e JAK2	Comparação de danos induzidos por radiação ionizante
Mohseni Meybodi & Mozdarani	2009	Linfócitos de Anemia de Fanconi	Humanos	Cromossomos 13 e 16 totais	Dano ao DNA após irradiação gamma e tratamento com Mitomicina C
Reiter <i>et al</i>	2009	Mucosa orofaríngea	Humanos	Cromossomos 3, 5, 8 e 11 totais	Danos ao DNA como resposta ao estresse oxidativo por hidróxido de hidrogênio
Reiter <i>et al</i>	2009	Mucosa orofaríngea com e sem câncer	Humanos	Cromossomos 1, 3, 5 e 8 totais	Fragmentação do DNA após incubação com Benzo(a)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE)
Mosesso <i>et al</i>	2010	Linfócitos	Humanos	Cromossomos 18 e 19 totais	Dano e reparo após irradiação com raios-X
Reiter <i>et al</i>	2010	Mucosa orofaríngea	Humanos	Gene EGFR e centrômero do cromossomo 7	Fragmentação do DNA após incubação com Benzo(a)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE)

#### IV – RESULTADOS ADICIONAIS

Ao compararmos as doses equivalentes nos dois tratamentos, observamos que a dose de 500mg/Kg de Sulfato de Cobre resultou numa citotoxicidade muito maior, uma vez que este tratamento teve uma mortalidade de 81.25% durante os 60 dias de contaminação, do que a observada na mesma dose de Sulfato de Alumínio.

Com a utilização do teste de Kruskal Wallis, podemos observar que os resultados obtidos pelo ensaio cometa na dose de 5 mg/Kg nos tecidos sanguíneo, hepático, renal e cerebral não são diferentes ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos com sulfato de cobre e sulfato de alumínio. O mesmo se deu em relação aos danos observados na dose de 50mg/Kg; com exceção do cérebro, que apresentou maiores danos nesta dose no tratamento com sulfato de alumínio ( $p < 0,05$ ). O alumínio é conhecidamente neurotóxico (YELLAMMA *et al*, 2010; XIAO *et al*, 2011), dado este corroborado por nossos resultados.

A toxicidade de cada metal varia de acordo com a espécie, porém, segundo Ximenes (2006), existe uma toxicidade relativa dos metais mais comuns no meio ambiente, em ordem decrescente de periculosidade: mercúrio, prata, cobre, zinco, níquel, chumbo, cádmio, arsênio, cromo, estanho, ferro, manganês, alumínio, berílio e lítio. Assim, esperava-se que o cobre induzisse um maior número de danos no ensaio cometa do que o alumínio, o que não foi observado no presente trabalho.

Diversos pesquisadores recomendam que na análise das lâminas do ensaio cometa não sejam contabilizadas as chamadas “células-fantasma”, possuidoras de danos numa extensão tal que não se observa a formação de “cabeça” no cometa (COLLINS *et al*, 2008). Esta recomendação se deve á associação destes nucleóides a possíveis células apoptóticas. Apesar de diversos trabalhos questionarem a confiabilidade desta associação (CHOUCRON *et al*, 2001; MEINTIERES *et al*, 2003; COLLINS *et al*, 2008), por precaução excluimos tais células da análise.

A esta exclusão pode se dever a semelhança entre os resultados dos tratamentos com sulfato de cobre e sulfato de alumínio. De fato, as lâminas de todos os tecidos analisados procedentes da contaminação com sulfato de cobre apresentaram um número extremamente grande de “células-fantasma”, ao contrário das resultantes da contaminação com sulfato de alumínio.

## V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um simples e barato biomarcador pode ser amplamente utilizado para demonstrar efeitos tóxicos em uma população, em um pequeno número de indivíduos de amostra da população (WALKER, 1998). Entretanto, a maioria das padronizações para agentes tóxicos são baseadas numa série de pressuposições. Por exemplo, que a resposta dos roedores para um agente possa ser extrapolada para os seres humanos, ou que a resposta de poucas espécies testadas para um agente possa ser extrapolada para a multiplicidade de vida de todo um ecossistema (BABICH & STOTZKY, 1983). Portanto, o ideal é que sejam estudadas espécies nativas ou representativas do ecossistema em foco (RAND *et al*, 1995).

Mas poucas espécies de peixe nativas têm sido empregadas nos estudos de toxicidade brasileiros. Sabe-se muito pouco sobre a sensibilidade de peixes neotropicais a poluentes, e as diretrizes toxicológicas para metais na maioria dos países tropicais são oriundos de dados coletados em outros ecossistemas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al*, 1996).

A exposição crônica e acumulação de metais pela biota aquática podem resultar na acumulação destes em tecidos, o que produz efeitos adversos não apenas para os organismos expostos, mas também para organismos de outros níveis tróficos – incluindo seres humanos (IARC, 1993). Entretanto, respostas tóxicas podem variar substancialmente de acordo com a espécie e reações a uma exposição subcrônica são diferentes das observadas em exposições agudas (KEEHAE & GANG-JOON, 2009).

Por esta razão, utilizamos no presente trabalho a espécie *Rhamdia quelen*, que possui distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul (SILFVERGRIP, 1996) para testar a genotoxicidade do Sulfato de Cobre e do Sulfato de Alumínio em contaminação subcrônica via trófica, por 60 dias.

O Sulfato de Cobre em tratamento subcrônico por 60 dias via trófica em *Rhamdia quelen* nas doses de 5, 30, 50 e 500 mg/Kg induziu quebras no DNA deflagradas pelo ensaio cometa nos tecidos cerebral, sanguíneo, renal e hepático, sendo o sangue o tecido menos sensível a mudanças de concentração do sulfato de cobre. O teste de micronúcleos píceos, no entanto, não demonstrou alterações significativas em relação ao controle negativo, assim como a frequência de eritrócitos policromáticos em relação ao número de eritrócitos totais. Não foi observado um aumento na frequência de células inviáveis no tecido sanguíneo.

O Sulfato de Alumínio em tratamento subcrônico por 60 dias via trófica em *Rhamdia quelen* nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg induziu danos observados no ensaio cometa nos tecidos cerebral, sanguíneo, renal e hepático, sendo o cérebro o tecido mais sensível ao contaminante e

o sangue o mais resistente. O teste de micronúcleos píceos, no entanto, só obteve resultados positivos na dose de 50 mg/Kg. Não houve alterações na percentagem de EPC com os tratamentos com sulfato de alumínio, e não foi observado um aumento na frequência de células inviáveis no tecido sanguíneo.

Em nenhum dos dois tratamentos observou-se um aumento na frequência de micronúcleos e alterações nucleares em relação ao controle negativo. Resultados de estudos de exposição a longo prazo em peixes revelaram que a frequência de micronúcleos em eritrócitos decresce após 14 e 21 dias (CAMPANA *et al*, 1995; TORRES DE LEMOS *et al*, 2001; ÇAVAS *et al*, 2005b), sugerindo que os eritrócitos são biomarcadores de genotoxicidade fracos para períodos de exposição acima de 21 dias. O período de 60 dias de contaminação utilizado no presente trabalho pode ter contribuído, portanto, para a ausência de micronúcleos nas células analisadas. Por outro lado, respostas tóxicas podem variar substancialmente de acordo com a espécie (KEEHAE & GANG-JOON, 2009), sendo possível que o *Rhamdia quelen* não seja um biomarcador suficientemente sensível para o teste de micronúcleos píceos após contaminação com metais.

O Ensaio Cometa, também conhecido por SCGE (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA que pode ser conduzido em qualquer tecido dos quais células ou núcleos individualizados possam ser preparados (RIBEIRO & ANDRADE, 2003). Há, entretanto, algumas desvantagens inerentes a este ensaio, como a incapacidade em medir o tamanho dos fragmentos entre lesões, o número de lesões e o local destas. Embora alguns tratamentos induzam uma grande variedade de lesões, que podem variar enormemente em toxicidade (SPIVAK, 2010), o ensaio cometa fornece informações apenas ao nível de dano geral ao DNA. Assim, sua combinação com a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) pode ser uma ferramenta interessante por permitir a alocação da sequência examinada na região danificada ou intacta do cometa, fornecendo informações adicionais sobre sequências ou regiões específicas do genoma (RAPP *et al*, 2005).

Apesar de ser uma ferramenta extremamente promissora, e de ser utilizado para responder as mais diferentes questões, relativamente poucos trabalhos empregaram o Cometa – FISH. Considerando, portanto, a relevância das informações que a técnica do Cometa-FISH pode trazer para os estudos ecotoxicológicos, e a possibilidade de obtermos resultados relevantes para a pesquisa com animais endêmicos, propusemos no presente trabalho a adaptação deste ensaio para a sua utilização em peixes como modelo biológico. A adaptação da técnica do Cometa-FISH para nucleóides de *Rhamdia quelen* foi parcialmente desenvolvido; entretanto,

seu índice de sucesso corresponde a cerca de 20% das lâminas hibridizadas, o que exige um aperfeiçoamento da técnica para que esta seja efetivamente utilizada.

## **VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGNELLO, L. M., FILOSTO, S., SCUDIERO, R., RINALDI, A. M., ROCCHERI, M. C. Cadmium induces an apoptotic response in sea urchin embryos. **Cell Stress & Chaperones**, v.12 (1), p. 44–50, 2007.

AHUJA. DNA in leukocytes of mice treated with Cu sulfate. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1931–1936, 2004.

ALFREY, A. C. Aluminum and tin. *In*: Bronner, F., Coburn, J. W. (Eds.), **Disorders of Mineral Metabolism**. Trace minerals Academic Press, New York, pp. 353-368, Vol. 1, 1981.

ALFREY, A. C. Aluminum and tin. *In*: Bronner, F.; Coburn, J. W. (Eds.) **Disorders of Mineral Metabolism**, v. 1. Trace minerals, Academic Press, New York, p. 353-368, 1981.

ALFREY, A. C. Aluminum intoxication. **N. Engl. J. Med.**, v.310, p.1113- 1114, 1984.

ALFREY, A. C. Aluminum metabolism in uremia. **Neurotoxicology**. v1, p.43-53, 1980.

ALFREY, A. C., HEGG, A., CRASWELL, P Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 33, p.1509-1516, 1980.

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

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

AMENDOLA R, BASSO E, PACIFICI PG, PIRAS E, GIOVANETTI A, VOLPATO C, ROMEO G. Ret, Abl1 (cAbl) and Trp53 gene fragmentations in comet-FISH assay act as in vivo biomarkers of radiation exposure in C57BL/6 and CBA/J mice. **Radiat Res**. 165(5):553-61, 2006.

ANDERSON, D., YU, T.W., BROWNE, M.A. The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) assays, **Mutat. Res**. v. 390, p. 69-77, 1997.

ANWAR, W.A. Biomarkers of human exposure to pesticides. **Environ Health Perspect.**, v.105, Suppl 4, p.801-806, 1997.

ARELLANO, J.M., STORCH, V., SARASQUETE, C.. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 44, 62–72, 1999.

ARUTYUNYAN, R., GEBHART, E., HOVHANNISYAN, G., GREULICH, K.O., RAPP, A. Comet-FISH using peptide nucleic acid probes detects telomeric repeats in DNA damaged by bleomycin and mitomycin C proportional to general DNA damage, **Mutagenesis**, v. 19, p. 403-408, 2004.

ARUTYUNYAN, R., RAPP, A., GREULICH, K.O., HOVHANNISYAN, G., HAROUTIUNIAN, S., GEBHART, E. Fragility of telomeres after bleomycin and cisplatin

combined treatment measured in human leukocytes with the Comet-FISH technique, **Exp. Oncol.**, v. 27, p. 38-42, 2005.

ASHBY, J. Genotoxicity testing: to which extent can it recognize mutagens and carcinogens? In: Clayson, J. B., Munro, I. C., Shubik, D., Swenberg, J. A. (Eds.). **Progress in Predictive Toxicology**, Elsevier, Amsterdam, p. 185-205, 1990.

AU, D.W., REUNOV, A. A., WU, R.S. Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development. **Environ Pollut.**, v. 111, p. 11–20, 2001.

AVERY, S. V., HOWLETT, N. G., RADICE, S. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence of plasma membrane fatty acid composition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p.3960–3966, 1996.

AYLLON, F., GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutat Res.**, v. 467, p.177-186, 2000.

BAATOUT, S., DERRADJI, H. Cytometric methods to analyze radiation effects. **J Biol. Regul. Homeost. Agents** v. 18, p. 101-105, 2004.

BABICH, H., STOTZKY, G. Developing Standards for Environmental Toxicants: The Need to Consider Abiotic Environmental Factors and Microbe-Mediated Ecologic Processes. **Environmental Health Perspectives**, v. 49, p. 247-260, 1983.

BAGDONAS, E., VOSYLIENE, M.Z. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biologija**. 1, 8–13, 2006.

BAKER, R. S. U. Evaluation of metals in in vitro assays, interpretation of data and Possible mechanisms of action. **Toxicol. Environ. Chem.**, V. 7, P. 191-212, 1984.

BARKER, P.E., WANG, W., WAGNER, P.D., PINSKY, P. Inter-rater agreement on chromosome 5 breakage in FISH-based mutagen sensitivity assays (MSAs), **Mutat. Res.** v. 562, p. 133-142, 2004.

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.

BARCELLOS, J.L.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIOREZE, I.; CERICATO, BARRETT, J. C., VAINIO, H., PEAKALL, D., GOLDSTEIN, B. D. 12th Meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals: Susceptibility to Environmental Hazards. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, Supplement 4, June 1997.

BARCELLOS, J.L.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIOREZE, I.; CERICATO, L. ; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; BALDISSERA, R.K.; BRUSCHI, A; RITTER,

- F. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, p. 383-394, 2004.
- BARTELL, S.M., GARDNER, R.H, O'NEILL, R.V. **Ecological Risk Estimation**. Michigan: Lewis, 1992.
- BATLEY, G. E. (ed) Trace element speciation: Analytical Methods and Problems. **CRC Press**. Inc. Boca Raton, FL, USA, 1989.
- Bedford Institute of Oceanography. **BIO 2002 in Review: Fisheries and Oceans Canada and Natural Resources Canada**. Bedford Institute of Oceanography. Her Majesty the Queen in Right of Canada, 2003.
- 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
- BERNARD, A., LAUWERYS, R. Cadmium NAG activity, and 2-microglobulin in the urine of cadmium pigment workers. **Br J Ind Med.**, v. 46, p.679-680, 1989.
- BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais na grande São Paulo. **Ciência e Cultura**, 42 (3/4), p. 271-277, 1990.
- BERTOLETTI, E., GHERARD GOLDSTEIN, E., NIPPER, M. G.. Toxicidade de efluentes industriais na grande São Paulo. **Revista DAE**, v. 49 (155), p. 63-70, 1989.
- BHUNYA SP, JENA GB. Clastogenic effects of copper sulphate in chick *in vivo* test system. **Mutat Res.**; v.367(2), p. 57-63, Feb.1996.
- BHUNYA, S.P., PATI, P.C. Genotoxicity of an inorganic pesticide, copper sulphate, in a mouse in vivo test system. **Cytologia**. 52, 801–808, 1987.
- BLACK, J.J., BAUMANN, P.C. Carcinogens and cancers in freshwaterfishes. **Environ Health Perspect**, v. 90, p.27-33, 1991.
- BLAKE, J. A. R., PRITCHARD, M., DING, S., SMITH, G. C. M., BURCHELL, B., WOLF, C. R., FRIEDBERG, T. Coexpression of a human P-450 (CY3A4) and P-450 reductase generates a highly functional monooxygenase system in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.**, 397: 210-214, 1996.
- BOBERG, E. W., LIEM, A., MILLER, E. C., MILLER, J. A. Inhibition by pentachlorophenol of the initiating and promoting activities of 1`-hydroxysafrole for the formation of enzyme-altered foci and tumors in rat liver. **Carcinogenesis**, v.8, p.531-539, 1987.
- BOCK, C., RAPP, A., DITTMAR, H., MONAJEMBASHI, S., GREULICH, K.O. Localisation of specific sequences and DNA single strand breaks in individual UV-A irradiated human lymphocytes by COMET FISH, **Progress in Biomedical Optics**, n. 3568, p.207-217, 1999.
- BOLOGNESI, C., HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis** vol. 26 no. 1 pp. 205–213, 2011

BONAVENTURAL, C.; JOHNSON, M. G. Healthy Environments for Healthy People: Bioremediation Today and Tomorrow. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, Supplement 1, feb 1997.

BORG, H. Trace elements in lakes. 117-201. *In*: Salbu, B., Steinnes, E. (Eds). **Trace elements in natural waters**. CRC press, Boca Raton, USA, 1995.

BORGHOFF, S. J., SHORT, B.G., SWENBERG, J. A. Biochemical mechanisms and pathobiology of  $\alpha_2\mu$ -globulin nephropathy. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.30, p. 349-367, 1990.

BOUDOU, A., DELNOMDEDIEU, M., GEORGESCAULD, D., RIBEYRE, F., SAOUTER, E. Fundamental roles of biological barriers in mercury accumulation and transfer in freshwater ecosystems: analysis at the organism, organ, cell and molecular level. **Water Air Soil Pollut**, v 56, p.807-821, 1991.

BOUDOU, A., RIBEYRE, F. Fundamental concepts in aquatic Ecotoxicology. *In*: BOUDOU, A., RIBEYRE, F. (Eds). **Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies**, v 1, Boca Raton, FL: CRC Press; p. 35-75, 1989.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Aquatic Ecotoxicology: From the Ecosystem to the Cellular and Molecular Levels. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, Supplement 1, Feb 1997.

BOWDEN RD, BUCKWALTER MR, MCBRIDE JF, JOHNSON DA, MURRAY BK, O'NEILL KL. Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay. **Mutat Res**, 537:1-9, 2003.

BOWEN, H. J. M. **Trace metals in biochemistry**. Academic press, London, 1966, 241 p.

BRITSKI, H. A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática**. São Paulo: USP, Faculdade de Saúde pública; Instituto de Pesca, 216 p., 1972.

BROWN, D. J. A. Effect of calcium and aluminum concentrations on the survival of brown trout (*Salmo trutta*) at low pH. **Bull Environ. Contam. Toxicol.**, v.30, p.582-587, 1983.

BÜHLER, E.M. Molecular approaches to cytogenetics. **Molecular Aspects of Human Genetic**, England, v. 1, p.135-46, 1989.

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

BURNEL, D., HUTIN, M. F, NETTER, P., KESSLER, M., HURIET, C., GAUCHER, A. Interet du dosage de l'aluminium osseux par polarographie impulsionnelle. **Pathol. Biol.** (Paris) v.30, p. 27-32, 1982.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. Ed. Intramericana, 6ª edição, 1988.

- CAMPANA, M.A., PANZERI, A.M., MORENO, V.J., DULOUT, F. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutat. Res.** 438, 155–161, 1995.
- CANONICO, B., ZAMAI, L., BURATTINI, S., GRANGER, V., MANNELLO, F., GOBBI, P., FELICI, C., FALCIERI, E., REILLY, J.T., BARNETT, D., PAPA, S.. Evaluation of leukocyte stabilisation in TransFix<sup>®</sup> -treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy. **J. Immunol. Methods**, v.295, p.67– 78., 2004.
- 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. **Can. J. Fish. Sci.**, Ottawa, vol.47, p.2123 – 2136, 1990.
- ÇALTA, M. Changes in the whole body mineral concentration of the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) yolk-sac fry exposed to various combinations of aluminium and calcium concentrations in two different acidic water. **Turkish Journal of Zoology** 23, 293–298. 1999.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.19, p.107-111, 2005.
- ÇAVAS, T., GARANKO, N., ARKHIPCHUK 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(4), p.569-574, 2005.
- CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M.; RIBEIRO, C. A. O; COSTA, R. M; PELLETIER, E; FERRARO, M. V. M. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, 27, 2, 270-274, 2004.
- CHAIRI H, FERNÁNDEZ-DIAZ C, NAVAS JI, MANCHADO M, REBORDINOS L, BLASCO J. In vivo genotoxicity and stress defences in three flatfish species exposed to CuSO<sub>4</sub>. **Ecotoxicol Environ Saf.** 73(6):1279-85, 2010.
- CHAPMAN, P.M. Do sediment toxicity tests require field validation? **Environ Toxicol Chem.**, v. 14, p.451-1453, 1995.
- CHOPRA, R.; PU, Q. Q.; EÇEFANTY, A. G. Biology of BCR-ABL. **Bood Reviews**, v.13, p. 211-229, 1999.
- CIESIELSKI, S., LOOMIS, D.P., MIMS, S.R., AUER, A. Pesticide exposures, cholinesterase depression, and symptoms among North Carolina migrant farmworkers. **Am J Public Health.**, v. 84(3), p.446-51, 1994.
- COLLINS AR, DOBSON VL, DUSINSKA M, KENNEDY G, STETINA R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutat Res** 376:183–193, 1997.

CONSTAN, G., BERMINGHAM, N., BLAISE, G., FERRARD, J. F. Potential ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. **Environmental Toxicology and Water Quality: an International Journal**, v. 8, p. 115-140, 1993.

COOK, P. R., BRAZELL, I. A. Conformations constraints in nuclear DNA. **J. Cell Sci.**, v. 22, p.287-302, 1976.

COOK, P. R., BRAZELL, I. A. Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei. **Eur. J. Biochem.**, v. 84, p. 465-477, 1978.

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.

CRAPPER, D. R., KRISHNAN, S. S., QUITTKAT, S. Aluminum, neurofibrillary degeneration and Alzheimer's disease. **Brain.**, v. 99, p.67-80, 1976.

CRAPPER, D. R., TOMKO, G. J. Neuronal correlates of an encephalopathy associated with aluminum neurofibrillary degeneration. **Brain Res.**, v. 97, p.253-264, 1975.

CUI, J.-G., COLANGELO, V., KRUCK, T.P.A., KURODA, H., LIALIN, T., SCHURR, J., BAZAN, N.G., LUKIW, W.J. Aluminium triggers NF-kB signaling, pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human neural cells in primary culture: implications for Alzheimer's disease. *In*: **Proceedings of the Fifth Kiel Meeting on Aluminium**, 22-25, 2003.

CULOTTA, V. C., KLOMP, L. W. J., STRAINS, J., CASARENO, R. L. B., KRENS, B., GITKIN, J. D. The Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. **J. Bio. Chem.**, v. 272, p. 23469, Sept. 1997.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *In*: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. *In*: de jundiás (*Rhamdia* spp) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae).. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980.

DAVID, D., RUTSTEIN, M.D., ROBERT, J., MULLAN, M.D., TODD, M., FRAZIER, S.C.M., WILLIAM, E., HALPERIN, M.D., JAMES M., MELIUS, M.D., JOHN, P., SESTITO, M.S. Sentinel Health Events (Occupational): A Basis for Physician Recognition and Public Health Surveillance. **AJPH**, v. 73, nNo. 9., Sept 1983.

DAVID, J., PERRIN, H., SCHIEFER, B., BLAKLEY, B. R. Chronic copper toxicity in a dairy herd. **Can Vet J.**, v. 31, p. 629-632, 1990.

DEBONI, U., OTVOS, A., SCOTT, J. W., CRAPPER, D. R. Neurofibrillary degeneration induced by systemic aluminum. **Acta Neuropathol.**, v. 35, p.285-294, 1976.

DEBONI, U., SEGER, M., AND CRAPPER MCLACHLAN, D. R. Functional consequences of chromatin bound aluminum in cultured human cells. **Neurotoxicology**, v. 1, p. 65-81, 1980.

DIX, T. A.; MARNETT, L. J. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives to ultimate carcinogens during lipid peroxidation. **Science**, v. 221, p. 77-79, 1983.

DOBSON, C.B., DAY, J.P., KING, S.J., ITZHAKI, R.F. Location of aluminium and gallium in human neuroblastoma cells treated with metal-chelating agent complexes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 152,145–152, 1998.

Draft for Development. **Code of Practice for the Identification of Potentially Contaminated Land and its Investigation**. DD 175/1988.

ELOVAARA, E., HEIKKILA, P., PYY, L., MUTANEN, P., RIIHIAMKI, V. Significance of dermal and respiratory uptake in creosote workers: exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary excretion of 1-hydroxypyrene. **Occup Environ Med.**, v. 52, p.192-203, 1995.

ERIKSSON, S., NYGREN, J., AHNSTROM, G. Matrix association of early and late replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1590, p.103-108, 2002.

ESCOBAR, P; SMITH, M; VASISHTA, A; HUBBARD, A; ZHANG, L. Leukaemia-specific chromosome damage detected by comet with fluorescence *in situ* hybridization (comet-FISH). **Mutagenesis**, vol. 22 no. 5 pp. 321–327, 2007.

ESTEVEES, F. DE A., BARBOSA, F. A. R. Eutrofização artificial. A doença dos lagos. **Ciência Hoje**, v.5 (27), p.56-61, 1986.

ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. FINEP. Ed interciência. Rio de janeiro, 575 p. 1988.

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

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

FERNANDEZ, J.L., VAZQUEZ-GUNDIN, F., RIVERO, M.T., GENESCA, A., GOSALVEZ, J., GOYANES, V. DBD-fish on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single- and doublestrand breaks in individual cells, **Exp. Cell Res.**, v. 270, p. 102-109, 2001.

FERNANDEZ, N., BEIRAS, R. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea urchin. **Ecotoxicology**, v.10, p. 263–271, 2001.

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.

FOY, C. D. Effects of aluminum on plant growth. *In*: Carson, E. W. (Ed.). **The Plant Root and Its Environment**, Univ. Press of Virginia, Charlottesville, pp. 601-642, 1974.

- FURST, A. Toward mechanisms of metal carcinogenesis. *In*: FISHBEIN, L., FURST, A., In: FRIBERG, L., NORDBERG, G. F., VOUK, V. B. (Eds.), **Handbook on the Toxicology of Metals**, 2nd ed., v. 2 Elsevier, Amsterdam, p. 319-390, 1986.
- GABBIANELLI, R., LUPIDI, G., VILLARINI, M., FALCIONI, G. DNA damage induced by copper on erythrocytes of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* and Mollusk *Scapharca inaequivalvis*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 45, 350–356, 2003.
- GALL, J.G., PARDUE, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proc Natl Acad Sci (US)**, v. 63(2), p.378-83, Jun 1969.
- GANROT, R. Metabolism and Possible Health Effects of Aluminum. **Environmental Health Perspectives.**, v. 65, p. 363-441, 1986.
- GARCÍA-MEDINA, S., RAZO-ESTRADA, C., GALAR-MARTINEZ, M., CORTÉZ-BARBERENA, E., GÓMEZ-OLIVÁN, L. M., ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I., MADRIGAL-BUJAJIDAR, E. Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*) **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 153: 113–118, 2011.
- GARDNER, E. J.; SNUSTAD, D. P. **Genética**. Editora Intramericana, 7ªd., 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.
- GHETTI, B., GAMBETTI, P. Comparative immunocytochemical characterization of neurofibrillary tangles in experimental maytansine and aluminum encephalopathies. **Brain Res.**, v. 276, p.388-393, 1983.
- GIANNOTTI, E., VANDIN, L., REPETO, P., COMELLI, R. A comparison of the *in vitro* Comet assay with the *in vitro* chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals, **Mutagenesis** v. 17, p.163-170, 2002.
- GLEI, M., HOVHANNISYAN G., POOL-ZOBEL, B.L. Use of Cometfish in the study of Dna damage and repair (Review), **Mutation Research-Reviews in Mutation Research** (2007), doi:10.1016/j.mrrev.2008.01.006
- GOMES, L. C., GOLOMBIESKI, J. I., GOMES, A. R. C., BALDISSEROTTO, B. biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (teleostei, pimelodidae) biology of *Rhamdia quelen* (teleostei, pimelodidae) **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPARI GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GOMES-CARNEIRO, M.R.; RIBEIRO-PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 13 (Supl.1), p. 27-38, 1997.

GORMICAN, A. Inorganic elements in foods used in hospital menus. **J. Am. Diet. Assoc.**, v.56, p.397-403, 1970.

GRAY, J. W.; PINKEL, D.; BROWN, J. M. Fluorescence *in situ* hibridization in cancer and radiation biology. **Radiat. Res.**, v. 137, p.275-289, 1994.

GREGER, J.L. Aluminium metabolism. **Annu. Rev. Nutr.** 13,43–63, 1993.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, K.T. LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à Genética**. 7ª Edição. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2002. 794p.

GUEDES, D.S. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação

GUENGERICH, F. P. Separation and purification of multiple forms of microsomal citochrome P-450. Partial characterization of three apparently homogeneous cytochromes P-450 prepared from livers of phenobarbital and 3-methylcholanthrene-treated rats. **J. Biol. Chem.**, v. 532, p.7931-7939, 1978.

GUENGERICH, F. P. Biotransformation. Pergamon Press, **Comprehensive Toxicology**, Oxford, 3, 1997.

GUENGERICH, F. P. Forging the links between metabolism and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 488, p. 195-209, 2001.

GUENGERICH, F. P., DANNAN, G. A., WRIGHT, S. T., MARTIN, M. V., KAMINSKY, L. S. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or  $\beta$ -naphthoflavone. **Biochemistry**, v.21, p. 6019-6030, 1982.

GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 4, p.391-407, 1991.

GHISI N<sub>2</sub> 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.

GUSTAVINO, B.; SCORNAJENGHI, K.A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicines. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 494, p. 151 – 159, 2001.

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

HADDOW, A., HORNING, E. S. On the carcinogenicity of iron-dextran complex. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 24, p.109-147, 1960.

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.

HANDY, R. D. The accumulation of dietary aluminum by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, at high exposure concentrations. **J. Fish. Biol.** 42, 603–606. 1993.

HANDY, R.D. Dietary exposure to toxic metals in fish. *In*: Taylor, E.W. (Ed.), **Toxicology of Aquatic Pollution**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 29–60. 1996.

HANDY, R.D., SIMS, D.W., GILES, A., CAMPBELL, H.A., MUSONDA, M.M. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. **Aquat. Toxicol.** 47, 23–41. 1999.

HARREUS, U.A., KLEINSASSER, N.H., ZIEGER, S., WALLNER, B., REITER, M., SCHULLER, P., BERGHAUS, A. Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence *in situ* hybridization, **Mutat. Res.**, v. 563, p.131-138, 2004.

HARSHBARGER, J.C., CLARK, J.B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. **Sci Total Environ**; v. 94, p.1–32, 1990.

HATANAKA, J., DOKE, N., HARADA, T., AIKAWA, T., ENOMOTO, M. Usefulness and rapidity of screening for the toxicity and carcinogenicity of chemicals in the medaka, *Oryzias latipes*. **Japan J Exp Med**;v. 52, p.243–253, 1982.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vitro* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p.187-190, 1973.

HEDDLE, J. A.; CARRANO, A. V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by  $\gamma$ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. **Mutation Research**, v. 44, p. 63-69, 1977.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMON, M. F. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research – Genetic Toxicology**. v. 123, p. 61 – 118, 1983.

HEGARETH, H.; WIKFOURS, G. H.; SOUDANT, P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p 249-265, 2003.

HEWITT C. J. AND NEBE-VON-CARON, G. An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. **Cytometry**, v. 44, p. 179-187, 2001.

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

HORVATHOVA, E., DUSINSKA, M., SHAPOSHNIKOV, S., COLLINS, A.R. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, v. 19, p. 269-276, 2004.

HOSE J. E., CROSS J. N., SMITH S. G., DIEHL D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. *Marine Environ. Res.*, v. 22, p. 167–176, 1987.

HOVHANNISYAN, G., RAPP, A., ARUTYUNYAN, R., GREULICH, K.O., GEBHART, E. Comet-assay in combination with PNA-FISH detects mutagen-induced DNA damage and specific repeat sequences in the damaged DNA of transformed cells, *Int. J Mol. Med.*, v. 15, p. 437-442, 2005.

HUBER, C. T., FRIEDEN, E. The inhibition of ferroxidase by trivalent and other metal ions. *J. Biol. Chem.*, v. 245, p.3979-3984, 1970.

HUBER, R., KULKA, U., LORCH, T., BRASELMANN, H., ENGERT, D., FIGEL, M., BAUCHINGER, M. Technical report: application of the Metafer2 fluorescence scanning system for the analysis of radiation-induced chromosome aberrations measured by FISH chromosome painting. *Mutat. Res.* v. 492, p. 51-57, 2001.

JOHN, H.A., BIRNSTIEL, M.L., JONES, K.W. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, v. 223(206), p.582-7, Aug 1969.

KAIM, W. The Chemistry and biochemistry of the copper-radical interaction. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 761-768, 2003.

KAIM, W., SCHWEDERSKI, B. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of life**, John Wiley & Sons Ltd, cap. 10, 187-214, 1995.

KAMLESH K. YADAV, SUNIL P. TRIVEDI. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere*. 77 - 1495–1500, 2009.

KAMUNDE, C., GROSELL, M., LOTT, J.N.A., WOOD, C.M. Effects of dietary copper exposure on copper metabolism and gut morphology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 293–305, 2001.

KANE, A.S., GONZALEZ, J.F., REIMSCHUESSEL, R. Fish and amphibian models used in laboratory research. *Lab Anim.* NY; v. 25, p.33–38, 1996.

KAWANISHI, S., HIRAKU, Y., MURATA, M., OIKAWA, S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 822–832, 2002.

- 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.
- KEEHAE, P., GANG-JOON, H. Acute and Subacute Toxicity of Copper Sulfate Pentahydrate (CuSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) in the Guppy (*Poecilia reticulata*). **J. Vet. Med. Sci.** 71(3): 333–336, 2009
- KELLY, J. R., HARWELL, M.A. Indicators of ecosystem response and recovery. *In*: LEVIN, S.A., HARWELL, M.A., KELLY, J.R., KIMBALL, K.D.(Eds). **Ecotoxicology: Problems and Approaches**. New York:Springer-Verlag, p. 9-40, 1989.
- KHRISHNA, G., HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p.155-166, 2000.
- KLATZO, I., WISNIEWSKI, H., AND STREICHER, E. Experimental production of neurofibrillary degeneration. I. Light microscopic observations. **J. Neuropathol. Exptl. Neurol.**, v. 24, p.187-199, 1965.
- KNÖBEL, Y.; GLEI, M; WEISE, A; OSSWALD, K; FERHENRICH, A; RICHTER, K; CLAUSSEN, U; POOL-ZOBEL, B. Uranyl Nitratotriacetate, a Stabilized Salt of Uranium, is Genotoxic in Nontransformed Human Colon Cells and in the Human Colon Adenoma Cell Line LT97. **Toxicol. Sci.** 93(2), 286–297, 2006.
- KNÖBEL Y, WEISE A, GLEI M, SENDT W, CLAUSSEN U, POOL-ZOBEL BL. Ferric iron is genotoxic in non-transformed and preneoplastic human colon cells. **Food Chem Toxicol.** 45(5):804-11, 2007.
- 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.
- 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.
- KRUUS, P. DEMMER, M & MCCAWE. Chemicals in the environment. **Polyscience pubs. Montreal**, p. 104-128, 1991.
- LAHDETIE, J. Occupation- and exposure-related studies on human sperm. **J Occup Med.**, v. 37, p.922-930, 1995.
- LAI, J. C. K., BLASS, J. P Inhibition of brain glycolysis by aluminum. **J. Neurochemistry.**, v. 42, p. 438-446, 1984.
- LANNO, R.P., SLINGER, S.J., HILTON, J.W. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture** 49, 257–268. 1985.
- LANKOFF, A., BANASIK, A; DUMA, A.; OCHNIAK, E.; LISOWSKA, H.; KUSZEWSKI, T.; G' O' ZD' Z, 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.

LAUREN, D.J., TEH, S.J., HINTON, D.E. Cytotoxicity phase of dinitrosamine-induced hepatic neoplasia in medaka. **Cancer Res**, v.5, p.5504-5514, 1990.

LAUWERYS, R. R. Metals-epidemiological and experimental evidence for carcinogenicity. **Arch. Toxicol.**, v.13, p. 21-27, 1989.

LEBLANC, G. A.; BAIN, L. J. Chronic Toxicity of Environmental Contaminants: Sentinels and Biomarkers. **Environmental Health Perspectives**, v 105, Supplement 1, Feb. 1997.

LEITÃO, A. C.; GOMES, R. A. **Radiobiologia e Fotobiologia: Respostas celulares às lesões induzidas por agentes físicos e químicos**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1994.

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

LIEHR, T., STARKE, H., WEISE, A., LEHRER, H., CLAUSSEN, U. Multicolor FISH probe sets and their applications, **Histol. Histopathol.** v. 19, p.229-237, 2004.

LIMA PDL, LEITE DS, VASCONCELLOS MC, CAVALCANTI BC, SANTOS RA, COSTA-LOTUFO LV, PESSOA C, MORAES MO, BURBANO RR. Genotoxic effect of aluminium chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Food Chem Toxicol** 45:1154–1159, 2007.

LINDER, M.C. Changes in the distribution and metabolism of copper in cancer: a review. **Nutr. Grow. Cancer**, v. 27,n. 1, 1983.

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

LOPES, J.M. Influência do pH da água na sobrevivência e crescimento de larvas de jundiá *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824, PISCES, PIMELODIDAE) em duas épocas de desovas. Santa Maria – RS, 1998. 60 p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**, Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1998.

LOPES-POLEZA, S.; CESTARI, M.M.; FENOCCHIO, A. S. **Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios cometa e micronúcleo**. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, 2004.

LU, F.C. **Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.

MACECK, J. K. Aquatic toxicology: Fact or fiction? **Environmental Health Perspectives**, v.34, p.159-163, 1980.

- MAGOS, L. Epidemiological and Experimental Aspects of Metal Carcinogenesis: Physicochemical Properties, Kinetics, and the Active Species. **Environmental Health Perspectives.**, v. 95, p. 157-189, 1991.
- MANSOUR, J. M., EHRLICH, A., MANSOUR, T. E. The dual effect of aluminum as activator and inhibitor of adenylate cyclase in the liver fluke *Fasciola hepatica*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.112, p. 911-918, 1983.
- MARKESBERY, W R., EHNMANN, W D., HOUSSAIN, T. I. M., ALAUDDIN, M. GOODIN, D. T. Instrumental neutron activation analysis of brain aluminum in Alzheimer disease and aging. **Ann. Neurol.**, v.10, p. 511-516, 1981
- MARQUIS, J. K. Aluminum inhibition of human serum cholinesterase. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 31, p.164-169, 1983.
- MARQUIS, J. M., LERRICK, A. J. Noncompetitive inhibition by aluminum, scandium and yttrium of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 31, p.1437-1440, 1982.
- MATSUMOTO, H.E., HIRASAWA, E., TORIKAI, H., TAKAHASHI, E. Localisation of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acid. **Plant Cell Physiol.** 127, 2004.
- MCKELVEY-MARTIN, V.J., HO, E.T., MCKEOWN, S.R., JOHNSTON, S.R., MCCARTHY, P.J., RAJAB, N.F., DOWNES, C.S. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II Fluorescent *in situ* hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells, **Mutagenesis**, v. 13, p.1-8, 1998.
- MCKENNA, D.J., RAJAB, N.F., MCKEOWN, S.R., MCKERR, G., KELVEY-MARTIN, V.J. Use of the comet-FISH assay to demonstrate repair of the TP53 gene region in two human bladder carcinoma cell lines, **Radiat. Res.** v.159, p. 49-56, 2003.
- MCNEIL, N., RIED, T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. **Exp Rev Mol Med**, set 2000.
- MDEHLAN, M. A. (Eds.). Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Occurrence. **Princeton Scientific Publishing**, Princeton, NJ, pp. 295-327, 1987.
- MELAMED, M.R.; MULLANEY, P.F., MENDELSON, M.L. - **Flow cytometry and sorting**. John Wilwy & sons., 1979.
- MELLON, I., BOHR, V.A., SMITH, C.A., HANAWALT, P.C. Preferential DNA repair of an active gene in human cells, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 83, p.8878-8882, 1986.
- METCALFE, C.D. Tests for predicting carcinogenicity in fish. **CRC Rev Aquat Sci.**, v. 1, p.111-129, 1989.

- MEURER, S., ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. In: XII ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: SBI, 1997. 420 p. p. 29, 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.
- MILLER, C. A., LEVINE, E. M. Effects of aluminium salts on cultured neuroblastoma cells. **J. Neurochem.**, v. 22, p.751-758, 1974.
- MILLER, E. C. ; MILLER, J. A. Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. **Pharmacol. Rev.**, v. 18, p.805-838, 1966.
- MIX, M.C. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical review of the literature. **American Petroleum Institute**, Washington, 1985.
- MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay, **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v. 96, p. 1–42, 2005.
- MOLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures, **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v.98, p.336–345, 2006.
- MOHSENI MEYBODI A, MOZDARANI H. DNA damage in leukocytes from Fanconi anemia (FA) patients and heterozygotes induced by mitomycin C and ionizing radiation as assessed by the comet and comet-FISH assay. **Iran Biomed J.** 13(1):1-8, 2009.
- MONTEITH, D.K., VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage, **Mutat. Res.** v. 345, p. 97-103, 1995.
- MOORE, J. W. & RAMMAMORTHY, S. Heavy Metals in natural waters: applied monitoring and impact assessment. **Spring-verlag**, New York, 268p. 1984.
- MORIMURA, S., MATSUMOTO, H. Effects of aluminum on some properties and template activity of purified pea DNA. **Plant Cell Physiol.**, v. 19, p. 429-436, 1978.
- MORIMURA, S., TAKAHASHI, E., MATSUMOTO, H. Association of aluminum with nuclei and inhibition of cell division in onion (*Allium cepa*) roots. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 88, p. 395-401, 1978.
- MORITA, K., INOUE, S., MURAI, Y, WATANABE, K., SHIMA, S. Effects of the metals Be, Fe, Cu and Al, on the mobility of immunoglobulin receptors. **Experientia**, v. 38, p. 1227-1228, 1982.
- MOESSOA, P; PALITTI, F; PEPEA, G; PINEROB, J; BELLACIMAA, R; AHNSTROMC, G; NATARAJANA; A. Relationship between chromatin structure, DNA damage and repair following X-irradiation of human lymphocytes. **Mutation Research**, 701:86–91, 2010.

MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. Evidence-based health policy-lessons from the Global Burden of Disease Study. **Science**, v. 274, p. 740-743, 1996.

NEBE-VON-CARON, G., BADLEY, R.A. Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. **J. Microsc.**, v.179, p. 55-66, 1995.

NEBE-VON-CARON, G., STEPHENS, P.J., HEWITT, C.J., POWELL, J.R. BADLEY, R.A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **J. Microbiol. Methods**, v.42, p. 97-114, 2000.

NEET, K. E., FURMAN, T. C., HUESTON, W J. Activation of yeast hexokinase by chelators and the enzymic slow transition due to metal-nucleotide interactions. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 213, p.14- 25, 1982.

NORPPA, H., HIRVONEN, A., JARVENTAUS, H., UUSKULA, M., TASA, G., OJAJARVI, A., SORSA, M. Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. **Carcinogenesis**, v. 16, p.1261-1264, 1995.

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

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

NYHOLM, N. E. I. Evidence of involvement of aluminum in causation of defective formation of eggshells and of impaired breeding in wild passerine birds. **Environ. Res.**, v. 26, p.363-371, 1981.

OEHLKERS, E. Chromosome breaks influenced by chemicals. **Heredity**, 6(Suppl.), p. 95-105, 1953.

O'GARA, R. W, BROWN, J. M. Comparison of the carcinogenic action of subcutaneous implants of iron and aluminum in rodents. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 38, p. 947-957, 1967.

OLIVA, M., GARRIDO, M.C., PEREZ, E., GONZALEZ DE CANALES, M.L. Evaluation of acute copper toxicity during early life stages of gilthead seabream, *Sparus aurata*. **J. Environ. Sci. Health A: Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.** 42,525–533, 2007

OLIVE, P. L., BANATH, J. P. Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. **Radiat. Res.**, v. 142, p.144-152, 1995.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical Biophysical Research Commun**, v. 123, p 291-298, 1984.

OVREBO, S., FJELDSTAD, P.E., GRZYBOWSKA, E., KURE, E.H, CHORAZY, M., HAUGEN, A. Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in a highly polluted area of Poland. **Environ Health Perspect.**, v. 103, p.838-843, 1995.

- 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.
- PARK E, GLEI M, KNÖBEL Y, POOL-ZOBEL BL. Blood mononucleocytes are sensitive to the DNA damaging effects of iron overload--in vitro and ex vivo results with human and rat cells. **Mutat Res.** 1;619(1-2):59-67, 2007.
- PEAKALL, D.B. **Animal Biomarkers as Pollution Indicators**. London:Chapman and Hall, 1992.
- PEAKALL, D.B., WALKER, C.H. The role of biomarkers in environmental risk assessment 3: Vertebrates. **Ecotoxicology**, v.3, p.173-179, 1994.
- PETIT, T. L., BIEDERMAN, G. B., MCMULLEN, P A. Neurofibrillary degeneration, dendritic dying back, and learning-memory deficits after aluminum administration: implications for brain aging. **Exptl. Neurol.**, v. 67, p.152-162, 1980.
- PETIT, T. L., BIEDERMAN, G. B., MCMULLEN, P A. Neurofibrillary degeneration, dendritic dying back, and learning-memory deficits after aluminum administration: implications for brain aging. **Exptl. Neurol.**, v. 67, p.152-162, 1980.
- PIAIA, R., TOWNSEND, C.R., BALDISSEROTTO, B., Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquaculture International** v. 7, p. 201-205, 1999.
- PLAA, G. L. Present Status: toxic substances in the environment. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p.1010-1016, 1983.
- POSTON, H. A. Effects of dietary aluminum on growth and composition of young Atlantic salmon. **Progress. Fish-Cultur.** 53, 7–10. 1991.
- 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.
- RAMADE, F. Ecotoxicologie. Ed. Masson, Paris. 201p. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (eds). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Ed Rima, 2006, São Carlos-SP, 1977.
- 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.

RAPP, A.; HAUSMANN, M. AND GREULICH, K. O. *In*: KEOHAVONG, P. AND GRANT, S. (eds). **Molecular Toxicology Protocols**. Methods in Molecular Biology, V. 261. Ed. Humana Press, 2005.

RAZIN, S. V., GROMOVOA, I.I., IAROVAIA, O. V. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. *In* BEREZNEY, R., JEON, K. W., (eds): **Nuclear matrix: structural and functional organization**. California. Academic Press, pp 405-448, 1995.

REINFELDER, J. R., FISHER, N. S., LUOMA, S. N, NICHOLS, J. W., WANG, W. X.. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critic of the kinetic models approach. **The scienc of the total environment**, v. 219, p. 117-135, 1998.

REINECKE, S. A, REINECKE A. J. The Comet Assay as Biomarker of Heavy Metal Genotoxicity in Earthworms. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 46, 208–215, 2004.

REITER M, BAUMEISTER P, ZIEGER S, HARRÉUS U. Chromosomal alterations and mutagen sensitivity in human mucosal cells of the oropharynx and lymphocytes caused by BPDE. **Cancer Genomics Proteomics.** 6(5):247-54, 2009 a.

REITER M, SAWICKA A, BAUMEISTER P, WELZ C, SCHWENK-ZIEGER S, HARRÉUS U. Chromosomal alterations in mini organ cultures of human oropharyngeal mucosa cells caused by hydrogen peroxide. **Cancer Genomics Proteomics.** 6(5):275-80, 2009 b.

REITER M, WELZ C, BAUMEISTER P, SCHWENK-ZIEGER S, HARRÉUS U. Mutagen sensitivity and DNA repair of the EGFR gene in oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, 46(7):519-24, 2010.

REJ, R., BRETAUDIÈRE, J.-P Effects of metal ions on the measurement of alkaline phosphatase activity. **Clin. Chem.**, v.26, p.423- 428, 1980.

RIBEIRO, L. R.; ANDRADE, H. H. R. Métodos para o diagnóstico da exposição genotóxica ambiental e ocupacional. *In*: MARQUES, E. K (org). **Diagnóstico Genético-Molecular**, Ed. Da ULBRA, 2003.

RILEY, R.S., MAHIN, E.J., Clinical applications of flow cytometry. **ASCP National Meeting**. Las Vegas, Nevada, 1988.

ROSIN, M.P. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemotherapeutic agents. **Mutat Res.**, v. 267, p.265-276, 1992.

ROY, A.K., SHARMA, A., TALUKDER, G. A time-course study on effects of aluminium on mitotic cell division in *Allum sativum*. **Mutat. Res.** 227, 221–226, 1989.

RUBNITZ, J. E., PUI, C. H.; DOWNING, J. R. The role of tel fusion genes in pediatric leukemias. **Leukemia**, v.13, p. 6-13, 1999.

- SAKAMOTO-HOJO, E. T., VAN DIEMEN, P.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Spontaneous chromosomal aberrations in Fanconi anemia, ataxia telangiectasia fibroblast and Bloom's syndrome lymphoblastoid cell lines as detected by conventional cytogenetical analysis and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique. **Mutation Res.**, v. 334, p.59-69, 1995.
- SALOMONS, W., KERDIJK, H., VAN PAGEE, H., KLOMP, R. SCHREUR, A. Behavior and impact assessment on heavy metals in estuarine and coastal zones. 157-198. *In*: Seeliger, U., Lacerda, L. D., Patchineelan, S. R. (eds). Metals on Coastal Environments of latin america. **Springer-Verlag**, Germany, 1988.
- SALVAGNI J, TERNUS RZ, FUENTEFRIA AM. Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil. **Genet Mol Biol.** 34(1):122-6, 2011
- SAMALI, A., COTTER, T.G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis., **Exp Cell Res.** v. 223, p. 167–170, 1996.
- SANTOS, L.M.F. Atividade de etoxiresorufina-O-desetilase, frequência de micronúcleos, níveis de metais, índice hepático e fator de condição em peixes provenientes da bacia do rio Paraíba do Sul, **Dissertação de Mestrado**, Rio de Janeiro, 2004.
- SANTOS, S.J., SINGH, N.P., NATARAJAN, A.T. Fluorescence *in situ* hybridization with comets, **Exp. Cell Res.**, v. 232, p. 407-411, 1997.
- SARKAR, B. J. Copper transport and its defect in Wilson disease: characterization of the copper-binding domain of Wilson disease ATPase. **Inorg. Biochem**, v. 79, 187, 2000.
- SATO, A.; TOMITA, I. Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: current status and problems of an *in vivo* rodent micronucleus assay. **Journal of Health Science**, v. 47 (1), p.1-8, 2001.
- 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.
- SCHAEFERHENRICH, A., BEYER-SEHLMAYER, G., FESTAG, G., KUECHLER, A., HAAG, N., WEISE, A., LIEHR, T., CLAUSSEN, U., MARIAN, B., SENDT, W., SCHEELE, J., POOL-ZOBEL, B.L. Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal, **Mutat. Res.**, v. 526, p. 19-32, 2003.
- SHAPOSHNIKOV, S; LARSSON, C; HENRIKSSON, S; COLLINS, A; NILSSON, M. Detection of Alu sequences and mtDNA in comets using padlock probes. *Mutagenesis* vol. 21 no. 4 pp. 243–247, 2006
- SHAPOSHNIKOV S, THOMSEN PD, COLLINS AR. Combining fluorescent *in situ* hybridization with the comet assay for targeted examination of DNA damage and repair. **Methods Mol. Biol.**, 11; 682, p. 115-32, 2010.

SHI, H., HUDSON, L.G., LIU, K.J. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. **Free Radic. Biol. Med.** 37, 582–593, 2004.

SCHLATTER, C. Speculation on the mechanisms of metal carcinogenesis. **Toxicol. Environ. Chem.**, v. 9, p.127-137, 1984.

SCHMID, W. Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells. **Agents and Actions**, v.3, p. 77-85, 1973.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.71, p.127-131, 1975.

SEIBERT, E B., WELLS, H. G. The effect of aluminum on mammalian blood and tissues. **Arch. Pathol.**, v. 8, p. 230-262, 1929.

SELKOE, D. J., LIEM, R. K. H., YEN, S. H., SELANSKI, M. L. Biochemical and immunochemical characterization of neurofilaments in experimental neurofibrillary degeneration induced by aluminum. **Brain Res.**, v. 163, p. 235-252, 1979.

SHAPIRO, H.M., **Practical flow cytometry**. Alan R. Liss, Inc., 1985.

SHI, H., HUDSON, L. G., LIU, K. J. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 37, p. 582, 2004.

SHIMOI, K.; TOMITA, I. Mutagens and antimutagens in the living environment. Eisei Kagaku. **J. Health Sci.**, v.37, p.149-178, 1991.

SILFVERGRIP, A.M.C. A sistematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia (Teleostei, Pimelodidae). Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (**PhD Thesis**) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

SILVA, F. R.; LAZZARIN, I. R.; SÁ-ROCHA, L. C.; MORGULIS, M. S. F. A.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, p 97-104, 2003.

SILVA, T. L., REIS, A., HEWITT, C., ROSEIRO, J. C. Citometria de Fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo II. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, N.º 77, pp32, Abril de 2004.

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.; MCCOY, M. T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191. São Paulo. **Secretaria do Meio Ambiente**. 1988 – Resolução SMA 65 de 13/08/98 publicada no D.O.E. – pág 27 em 14/08/98.

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

SKLAR, L. A., **Biotechnology**. Oxford University Press, US, 400 p. 2005.

SMITH, R. P. A primer of environmental toxicology. **Lea & Febiger pub.**, p.142-150, 1993.

SOLHEIM, L. P, FROMM, H. J. A simple method for removing aluminum from adenosine-5'-triphosphate. **Anal. Biochem.**, v. 109, p.266-269, 1980.

SORENSEN, J. R. J., CAMPBELL, I. R., TEPPER, L. B., AND LINGG, R. D. Aluminum in the environment and human health. **Environ. Health Perspect.**, v. 8, p.3-95, 1974.

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.

SPIVAK, G., COX, R. A., HANAWALT., P. C. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair, **Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.** (2008), doi:10.1016/j.mrrev.2007.12.003

STAURNES, M., SIGHOLT, T., REITE, O. B. Reduced carbonic anhydrase and Na-K-ATPase activity in gills of salmonids exposed to aluminium-containing acid water. **Experientia**, v. 40, p.226-227, 1984.

STERNWEIS, P C., GILMAN, A. G. Aluminum. A requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. **Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)**, v. 79, p. 4888-4891, 1982.

STITCH, S. R. Trace elements in human tissues. I. A semiquantitative spectrographic survey. **Biochem. J.**, v. 67, p.97-109, 1957.

STONER, G. S., SHIMKIN, M. B., TROXELL, M. C., THOMPSON, T. L., TERRY, L. S. Test for carcinogenicity of metallic compounds by the pulmonary tumor response in strain A mice. **Cancer Res.**, v.36, p.1744-1747, 1976.

STONER, G. S., SHIMKIN, M. B., TROXELL, M. C., THOMPSON, T. L., TERRY, SWIGER, R. R.; TUCKER, J. D. Fluorescence in situ hybridization: a brief review. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 27, p.245-254, 1996.

STRUNJAK-PEROVIC, I., COZ-RAKOVAC, R., TOPIC POPOVIC, N., JADAN, M. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. **Fish Physiol. Biochem.** 35, 287-291, 2009.

TALAPATRA, S.N., BANERJEE, S.K. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. **Food Chem. Toxicol.** 45 (2), 210-215, 2007.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Spatial and temporal variations of heavy metal contamination in mangrove swamp in hong kong. **Marine Pollution Bulletin**, 31 (4-12), p. 254-261, 1995.

- TERNJEJ, I., STANKOVIC, I., KEROVEC, M., KOPJAR, N. Application of the comet assay and detection of DNA damage in haemocytes of medicinal leech affected by aluminium pollution: A case study **Environmental Pollution** 157 : 1565–1572, 2009.
- TESSIER, A., TURNER, D.R. **Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems**. Chichester, England: J Wiley & Sons, 1995.
- THEODORAKIS CW, D'SURNEY SJ, SHUGART LR. Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. **Environ Toxicol Chem** 13:1023–1031, 1994.
- TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, **Environ. Mol. Mutagen.** v. 35, p. 206-221, 2000.
- TIRUKALIKUNDRAM, S., KUMARAVEL, T.S., BRISTOW, R.G. Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells using Comet-FISH, **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 91, p. 89-93, 2005.
- TORRES DE LEMOS, C., RDEL, M.P., TERRA, N.R., ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. **Environ. Toxicol. Chem.** 20 (6),1320–1324, 2001.
- TOUSSAINT, M. W., ROSENCRANCE, A. B., BRENNAN, L. M., BEAMAN, J. R., WOLFE, J. M., HOFFMANN, F. J., GARDNER, H. S. Chronic Toxicity of Chloroform to Japanese Medaka Fish. **Environmental Health Perspectives.**, v.109, no.1, Jan 2001.
- TOWNSEND, C.R., PIAIA, R., BALDISSEROTTO, B. Tolerância de alevinos de *Rhamdia quelen* (jundiá) a variações de pH e de dureza da água utilizada no cultivo. In: XXVI ENCONTRO ANUAL DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, Porto Alegre, 1997. **Anais...** Porto Alegre: SFRES, 88p. p. 65.1997.
- TOXNET. 1975-1986. National library of medicine's toxicology data network. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Public Health Service. National Institute of Health, U. S. Department of Health and Human Services. Bethesda, MD: NLM.
- TRAPP, G. A. Studies of aluminum interaction with enzymes and proteins -the inhibition of hexokinase. **Neurotoxicology.**, v. 1, p. 89-100, 1980.
- TRAUB, R. D., RAINS, T. C., GARRUTO, R. M., GAJDUSEK, D. C., GIBBS, C. J., Jr. Brain destruction alone does not elevate brain aluminum. **Neurology.** V. 31, p. 986-990, 1981.
- TRONCOSO, J. C., PRICE, D. L., GRIFFIN, J. W, PARHAD, I. M. Neurofibrillary axonal pathology in aluminum intoxication. **Ann. Neurol.**, v. 12, p.278-283, 1981.
- TUCKER, J. D.; MORGAN, W. F.; AWA, A. A.; BAUCHINGER, M.; BLAKEY, D.; CORNFORTH, M. N., LITTLEFIELD, L. G., NATARAJAN, A. T., SHASSERRE, C. A

proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 68, p.211-221, 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.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquat. Toxicol.** 79 (2), 201–204, 2006.

U.S. Environmental Protection Agency. **Peer Review Workshop Report on a Framework for Ecological Risk Assessment.** EPA 630/R-92/001. Washington, 1992.

US ARMY . Engineer waterways experiment station. **Environmental effects of dredging – technical notes: factors influencing bioaccumulation of sediment-associated contaminants by aquatic organisms: factors related to contaminants.** 5 p, 1989.

VALENTINE, J. S. & GRALLA, B. Delivering Copper Inside Yeast and Human Cells. **Science**, v. 278, p. 817-818, 1997.

VIEIRA, E. G. Avaliação de mutagenicidade por ensaios citogenéticos *in vivo* e *in vitro*. In: **Princípios Básicos da genética toxicológica.** UNESP – São Jose do Rio Preto, 54-62, 1987.

VIEIRA, V. L., NETO, J. R., LOPES, P. R.S., LAZZARI, R., FONSECA, M. B., MENEZES, C. C. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo aflatoxinas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 1, p. 49-55, jan./mar. 2006

VIERSTRA, R., HAUG, A. The effect of Al<sup>3+</sup> on physical properties of membrane lipids in *Thermoplasma acidophilum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**,v. 84, p.138-143, 1978.

VINE, M.F. Micronuclei. In: HULKA, B.S., WILCOSKY, T.C., GRIFFITH, J.D. (eds.). **Biological Markers in Epidemiology.** New York: Oxford University Press, pp. 125-146, 1990.

VOGEL, E. W. **Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology.** Blok: Milieuverstoring Genotoxische Stoffen, Leiden (The Netherlands), 43, 1989.

WALKER, C. H. Biomarker Strategies to Evaluate the Environmental Effects of Chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v 106, Supplement 2, April 1998.

VOLPATO, C; MARTINEZ-ALFARO, M; CORVI, R; GABUS, C; SAUVAIGO, S; FERRARI, P; BONORA, E; GRANDI, A; ROMEO, G. Enhanced Sensitivity of the RET Proto-Oncogene to Ionizing Radiation *In vitro*. **Cancer Res**;68:8986-8992, 2008.

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.

WALTER, R.B. Aquaria fish models of human disease. **Mar Biotechnol**, v.3, 2001.

WARD, R.J., ZHANG, Y., CRICHTON, R.R. Aluminium toxicity and iron homeostasis. **J. Inorg. Biochem.** 87, 9–14, 2001.

WEISBURGER, J. H. , WILLIAMS, G. M. The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk. **Toxicol. Sci.**, v.57, p.4-5, 2000.

WEISBURGER, J. H., AND WILLIAMS, G. M. Testing procedures to define carcinogens  
WEISBURGER, J. H., GRANTHAM, P. H., VANHORN, E., STEIGBIGEL, N. H., RALL, D. P., WEISBURGER, E. K. Activation and detoxification of N-2-fluorenylacetamine in man. **Cancer Res.**, v. 24, p.475-479, 1964.

WHO (World Health Organization). **International. DIG.** Health Leg., v.17, p.629-834. Geneva, 1967.

WIEGANT, J., WIESMEIJER, C. C., HOOVERS, J. M. N., SCHUURING, E., D'AZZO, A., VROLIJK, J., TANKE, H. J., RAAP, A. K. Multiple and sensitive fluorescence in situ hybridization with rhodamine, fluorescein and coumarin-labeled DNAs, **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 63, p.73-76, 1993.

WISNIEWSKI, H. M., STURMAN, J. A., SHEK, J. W Aluminum chloride induced neurofibrillary changes in the developing rabbit: a chronic animal model. **Ann. Neurol.**, v. 8, p. 479-490, 1980.

WISNIEWSKI, H., NARKIEWICZ, O., WISNIEWSKA, K. Topography and dynamics of neurofibrillar degeneration in aluminum encephalopathy. **Acta Neuropathol.**, v. 9, p.127-133, 1967.

WISNIEWSKI, H., TERRY, R. D. Experimental colchicine encephalopathy. I. Induction of neurofibrillary degeneration. **Lab. Invest.**, v. 17, p. 577-587, 1967.

WISNIEWSKI, H., TERRY, R. D., HIRANO, A. Neurofibrillary pathology. **J. Neuropathol. Exptl. Neurol.**, v. 29, p.163-176, 1970.

WOLFE, H.R., DURHAM, W.F., ARMSTRONG, J.F. Urinary excretion of insecticide metabolites. Excretion of para-nitrophenol and DDA as indicators of exposure to parathion. **Arch Environ Health**, v. 27, p.711-716, 1970.

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.

WOODHEAD, A.D. Nonmammalian Models in Biomedical Research. **CRC Press**; Boca Raton, Florida, 1989.

WRIGHT, A. S. The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 75, p.215-241, 1980.

XIAO F, LI XG, ZHANG XY, HOU JD, LIN LF, GAO Q, LUO HM. Combined administration of D-galactose and aluminium induces Alzheimer-like lesions in brain. **Neurosci Bull.** 27(3):143-55, 2011.

XIMENES, J. F. Enciclopédia Ambiental – Poluição Industrial. Disponível em: <http://www.enciopediambiental.hpg.ig.com.br>. Acesso em 18 de dezembro de 2007.

YAMAMOTO, K. I.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v.71, p.127-131, 1980.

YELLAMMA K, SARASWATHAMMA S, KUMARI BN. Cholinergic system under aluminium toxicity in rat brain. **Toxicol Int.**17(2):106-12.

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.

ZAGATTO, P. A., MOZETO, A. A. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (eds).: **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Ed Rima, 2006, São Carlos-SP.

ZHANG, Z., DMITRIEVA, N. I., PARK, J. H., LEVINE, R. L., BURG, M. B. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and *in vivo*, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. **PNAS**, v. 101, no. 25, p. 9491–9496, June 22, 2004.

ZIELHUIS, R.L. Theoretical and practical consideration in biological monitoring. *In*: AITIO, A., RIIHIMAKI, V., VANIO, H. (Eds). **Biological Monitoring and Surveillance of Workers Exposed to Chemicals**. New York:Hemisphere Publishing; p.7-18, 1984.

## **VII- ANEXOS**

### **Metodologia**

#### a. Teste do Micronúcleo Píscero (MNP)

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), com algumas modificações. A técnica aplicada consiste nas seguintes etapas:

- a) As lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) Ao se coletar o sangue do animal, pingou-se uma gota na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, foi feito um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina, sempre em um único sentido apenas.
- d) As lâminas, após secagem ao ar, foram fixadas em etanol 96%, por 30 minutos.
- e) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6), por 15 minutos.

f) As lâminas foram analisadas em teste cego, sendo que, foram analisadas 2000 células de cada animal. Na análise, foram consideradas somente hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intacta. Serão consideradas como micronúcleos as partículas que em relação ao núcleo principal não excederem 1/3 do seu tamanho, estiverem nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadrarem no conceito de micronúcleo, mas que poderiam ser descritas como alterações morfológicas nucleares também serão analisadas segundo CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) e computadas como AMN.

#### b. Teste do Micronúcleo em Eritrócitos Imaturos (EI)

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em eritrócitos jovens, foi empregada a técnica descrita por ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA (2005), com algumas modificações e a coloração dos eritrócitos realizada de acordo com UEDA et al. (1992). A técnica aplicada consiste nas seguintes etapas:

- a) As lâminas foram bem limpas e identificadas.

b) O sangue coletado (aproximadamente 1 ml) foi colocado em microtubos do tipo Eppendorf ®. Para a realização do ensaio cometa foram coletados 10µl de sangue de cada microtubo e misturados com 1 ml de soro bovino fetal. Neste caso, da mesma diluição retirou-se 10µl e colocou-se na superfície da lâmina.

c) Com o auxílio de uma lamínula, foi feito um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina, sempre em um único sentido apenas.

d) As lâminas foram então deixadas para secar overnight e foram fixadas, posteriormente em metanol, durante 10 minutos.

e) A coloração de laranja de acridina apenas foi acrescentada imediatamente antes da análise microscópica. As células foram coradas com laranja de acridina a 0.003%, em tampão Sorenson com pH 6.8, por 2-3 minutos e montadas com o mesmo tampão. As lâminas foram então analisadas ao microscópio de epifluorescência, com aumento de 400x.

f) A análise foi feita em teste cego, sendo que, foram analisadas 2000 células de cada animal. Na análise, foram consideradas somente hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intacta.

### c. Ensaio Cometa

A técnica utilizada foi a descrita por SINGH *et al.* (1988) com algumas modificações realizadas por FERRARO (2003). Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) segundo as etapas descritas a seguir:

#### 2. 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 então 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 lâmina 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 à temperatura ambiente, para solidificação da cobertura de agarose.

### 3. 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 então 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.

### Sangue

a) O sangue coletado (aproximadamente 1 ml) foi colocado em microtubos do tipo Eppendorf ®. Para a realização do ensaio cometa foram coletados 10µl de sangue de cada microtubo e misturados com 1ml de soro bovino fetal. Os microtubos foram mantidos sobre refrigeração e no escuro até a realização do ensaio.

b) Desta solução, foram coletados 10µl e misturados com 120µl de agarose LMP (low melting point), sendo esta suspensão celular depositada sob uma lâmina com cobertura de agarose.

c) Após a deposição da mistura agarose e suspensão celular sob a lâmina, foram colocadas lamínulas sobre cada lâmina e em seguida estas foram submetidas à refrigeração.

d) Após a refrigeração, as lamínulas foram gentilmente retiradas.

e) Estas foram então, acondicionadas em cubetas, contendo solução de lise por, pelo menos, 24 horas.

f) Após o tempo de lise, as lâminas foram então transferidas para a cuba de eletroforese. A eletroforese foi realizada sobre refrigeração e na ausência de luz, com uma solução de eletroforese com pH maior que 13.

g) Antes do início da corrida eletroforética, as lâminas permaneceram na solução de eletroforese por pelo menos 30 minutos, para a desespiralização do DNA.

h) Em seguida, a corrida de eletroforese foi iniciada a 25V e 300 mA por 25 minutos.

i) Após o término da corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5) por 3 seções de 5 minutos cada.

j) As lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos.

l) Para a análise das lâminas, foram adicionados 20µl de brometo de etídeo em cada uma delas. Cada lâmina foi então coberta com lamínula e levada ao microscópio de epifluorescência com aumento de 400x.

m) Foram analisados 100 núcleos em cada lâmina. Os núcleos foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. A classificação dos núcleos será realizada conforme as classes: 0 (sem dano aparente) a 4 (dano máximo). Foram realizadas as quantificações dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Os escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

### **Tecidos Hepático, Renal e Cerebral**

Para a realização do ensaio cometa utilizando tecidos hepático, renal e cerebral, foi utilizada uma metodologia que se constituiu das seguintes etapas:

a) Após o sacrifício dos animais e a retirada de sangue, foi retirado o tecido renal, hepático ou cerebral. Cada um destes foi inserido em um microtubo do tipo Eppendorf® e mantido em tampão Tris-HCl-Sacarose (pH 8,6) em gelo, e no escuro;

b) Os tecidos com o tampão Tris-HCl-Sacarose foi então levado para homogeneização em homogeneizador Potter® a 1500 rpm por cerca de 30 segundos;

c) Do homogeneizado obtido, foram coletados 40µl em microtubos do tipo Eppendorf®.

d) Para a realização do ensaio cometa, os 40µl coletados de homogeneizado foram então misturados com 120µl de agarose LMP (low melting point – baixo ponto de fusão).

e) A suspensão celular assim obtida foi utilizada para a montagem das lâminas, conforme o procedimento descrito acima para eritrócitos.