

Sabine De Cnop Granado Lopes-Poleza

Avaliação do efeito do metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de Aberrações Cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo.

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética, Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

Co-orientador: Dr. Alberto Sérgio Fenocchio

Curitiba

2004



Aosmeusamados  
MaurícioCesarPoleza  
JeanetteMonteiroDeCnop

*Nô tubo de ensaio,  
obstinado, o cientista  
procura a si mesmo.*

*Lena Jesus*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná, ao Setor de Ciências Biológicas e ao Departamento de Genética pela oportunidade.

À Professora Margarete e ao Professor Alberto Sérgio Fenocchio pelo apoio e pela dedicação durante o curso.

Aos Professores da Pós Graduação do Departamento pela paciência e competência na transmissão de seus conhecimentos.

Aos Professores Hiroko Nitta, Mário Sérgio Mantovani e Marina Izabel Mateus de Almeida pela atenção, comentários e observações.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Elizabete, Marli, Jorge e Valéria pela boa vontade com a qual sempre fui prontamente atendida.

Aos colegas dos laboratórios de Citogenética Animal e Bioensaios Rafael Noletto, Daniel Kantek, Roger Cipriano, Maria Cristina Cortinhas, Wanessa e Maritana Mela pela amizade e apoio quando necessários.

À Uniandrade e aos seus funcionários, os Biólogos Ana Cristina Dalla Costa, Paulo Henrique Machniewicz e Ricardo L. B. E. Abrahão pela ajuda que durante os dois anos do curso me foi dada.

À Lyia Mikami, Silmar Takatuzi, Luciana Grange por tornarem minha vida acadêmica mais alegre.

Aos meus amigos Luis Fernando Fávaro, Ana Cláudia Bonato, Tânia Martins Meira, Marcos Zandonadi e Eliege C. Pepler pelas palavras de apoio.

Ao Professor Marcos Vinícius Mocelin Ferraro por toda atenção, apoio durante o curso, paciência e tempo gasto nos comentários e observações.

Aos meus irmãos Pablo e sua esposa Aline, Murilo e sua namorada Giovana e Elise pelo amor, carinho e atenção.

À minha mãe e Prof<sup>a</sup> Jeanette Monteiro De Cnop pelo incentivo, apoio pela correção ortográfica e por todo o amor que me tem dado durante toda a vida.

Ao meu esposo Maurício Cesar Poleza pelo amor, empenho e companheirismo.

A Deus, sem o qual eu nada seria.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT .....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais .....	1
1.2. O mercúrio .....	6
1.3. Aspectos sistemáticos e ecológicos de <i>Hoplias malabaricus</i> . .....	13
1.4. Aspectos citogenéticos de <i>Hoplias malabaricus</i> .....	15
1.5. As Aberrações Cromossômicas.....	17
1.6. O Teste de Micronúcleos.....	19
1.7. O Ensaio Cometa .....	21
2. OBJETIVOS .....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1. Material.....	24
3.1.1. Organismo utilizado .....	24
3.1.2. Coleta e aclimação dos animais .....	24
3.2. Métodos.....	27
3.2.1. Tratamento dos animais .....	27
3.2.2. Sacrifício dos animais e obtenção de material para cada bioensaio .....	27
3.2.3. Análises .....	28
3.2.3.1. Metáfases dos peixes do grupo controle e do grupo contaminado.....	28
3.2.3.2. Teste dos Micronúcleos.....	30
3.2.3.3. Ensaio Cometa .....	31
3.2.3.4. Análises estatísticas .....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Caracterização citogenética e Aberrações Cromossômicas.....	34
4.2. Análise do Teste de Micronúcleo Pisceo .....	40
4.3. Análise do Ensaio Cometa .....	47
4.4. Danos causados pelo metilmercúrio em peixes.....	52
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ciclo natural do mercúrio. ....	8
FIGURA 2 – Intervenção antrópica.....	8
FIGURA 3 – Ciclo do mercúrio na biosfera.....	9
FIGURA 4 – Exemplar de <i>Hoplias malabaricus</i> .....	14
FIGURA 5 – Visão geral do Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular da UFPR. ....	25
FIGURA 6 – Disposição dos aquários onde ocorreram os períodos de aclimação e exposição dos animais. ....	25
FIGURA 7 – Aquário onde as traíras foram mantidas individualmente .....	26
FIGURA 8 - Retirada do sangue periférico da veia anal com seringa heparinizada.	27
FIGURA 9 – Exposição dos órgãos internos para a retirada do rim anterior, apontado pela seta. ....	28
FIGURA 10 – Metáfase normal de A) fêmea $2n=40$ e de B) macho $2n = 39$ de <i>Hoplias malabaricus</i> . ....	37
FIGURA 11 –Metáfases com alterações apontadas pelas setas.....	38
FIGURA 12 – Alterações morfológicas nucleares encontradas nos grupos controle e contaminado, no Ensaio Micronúcleo. ....	42
FIGURA 13 – Alterações morfológicas nucleares encontradas nos grupos controle e contaminado, no Ensaio Cometa.....	47

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Número de metáfases normais e com alterações estruturais em <i>H. malabaricus</i> não-contaminadas (controle) e contaminadas com metilmercúrio .	35
TABELA 2 – Teste qui-quadrado para a análise do teste de Aberrações Cromossômicas entre os grupos controle e contaminado (metilmercúrio) .....	36
TABELA 3 - Teste Mann-Whitney para o teste de Aberrações Cromossômicas entre os grupos controle e o contaminado (n1 e n2 = 9) .....	36
TABELA 4 – Número de células com núcleos normais e alterados em <i>Hoplias malabaricus</i> (traíras) não-contaminadas (controle) e contaminadas com metilmercúrio .....	41
TABELA 5 – Teste qui-quadrado entre os grupos controle e contaminado, exposto ao metilmercúrio, para análise do Teste de Micronúcleos.....	41
TABELA 6 - Teste Mann-Whitney entre os grupos controle e contaminado, exposto ao metilmercúrio (n1 e n2 = 9) para o Teste de Micronúcleo. ....	42
TABELA 7 - Número de núcleos de eritrócitos analisados, normais e alterados, com os respectivos danos, em <i>Hoplias malabaricus</i> (traíras) não-contaminadas (controle) e contaminadas com metilmercúrio .....	48
TABELA 8 - Teste qui-quadrado entre grupo controle e grupo contaminado, exposto ao metilmercúrio, para a análise do Teste Cometa .....	48
TABELA 9 - Teste Mann-Whitney para análise do Teste Cometa entre o grupo controle e o grupo contaminado (n1 e n2 = 9), exposto ao metilmercúrio .....	49

## RESUMO

A principal via de acesso do mercúrio em humanos é através da ingestão de organismos aquáticos, particularmente peixes, sendo que é no ambiente aquático que o mercúrio é organificado à sua forma mais tóxica, de metilmercúrio. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito genotóxico do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* através das frequências de aberrações cromossômicas (rim anterior), de micronúcleos e alterações na forma dos núcleos e do Ensaio Cometa em hemácias de sangue periférico (eritrócitos). Os organismos utilizados foram peixes da espécie *H. malabaricus*, predadores de hábito alimentar piscívoro, representando assim um nível trófico elevado dentro das cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos. Os grupos controle e contaminados continham cada um 9 exemplares. Foram administrados como alimento peixes vivos nos quais foi injetado metilmercúrio. A dose foi de 0,075µg de metilmercúrio/grama de peixe. Após 70 dias do início da contaminação, o que perfaz 13 doses, aplicadas a cada 96 horas os animais foram mortos. Foram analisadas 850 metáfases para o Teste de Aberrações Cromossômicas, 72.000 células para o Teste de Micronúcleos e 1.800 núcleos no Ensaio Cometa. Para análise dos resultados foram utilizados os testes estatísticos qui-quadrado e Mann-Whitney. Houve diferença significativa entre os grupos controle e contaminado no Teste de Aberrações Cromossômicas, para ambos testes estatísticos (material retirado de tecido). Na avaliação dos eritrócitos, a prova do qui-quadrado mostrou diferença no Teste de Micronúcleos e não no Ensaio Cometa. Mann-Whitney não mostrou diferença significativa em ambos testes. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o efeito genotóxico do metilmercúrio é o de bioacumular em tecidos e não em sangue circulante, portanto os testes que usam eritrócitos não são eficientes para avaliar o efeito desse metal na concentração utilizada.

## ABSTRACT

The primary method by which humans have access to mercury is through the ingestion of aquatic organisms, especially fish, and it is in the aquatic environment that mercury is organificated to its most toxic form, methylmercury. The aim of this work was to evaluate the genotoxic effect of methylmercury in *Hoplias malabaricus* through the frequency of chromosomal aberrancy in its anterior kidney, the frequency of micronuclei and alterations in the shape of the nuclei, as well as through the Comet Assay in erythrocytes. The organisms chosen for this research represent a high trophic level in the aquatic environment. The control and contaminated groups had nine samples each. *H. malabaricus* subjects were fed with some alive fish contaminated by methylmercury which had been previously administered, on a dose of 0,075 $\mu$ g of methylmercury per gram of fish. 70 days after the contamination had started (13 doses, one every 96 hours), the animals were sacrificed. A total of 850 metaphases were analyzed for the Chromosomal Aberrancy Test, 72,000 nuclei were analyzed for the Micronucleus Test, and 1,800 nuclei were analyzed for Comet Assay. The statistic tests Chi-Square and Mann-Whitney were administered for the analysis of results. According to both tests, significant differences were found between the control and contaminated groups in Comet Assay. In the analysis of erythrocytes, the results statistically treated with Chi-Square showed significant differences in the Micronucleus Test, but not in Comet Assay. Mann-Whitney did not present significant differences in any of the two tests. Based on the results found in this work, one can conclude that the genotoxic effect of methylmercury in *H. malabaricus* is to bioaccumulate in tissues but not in circulating blood. Therefore, the tests which use erythrocytes are not efficient in evaluating the effect of this metal in the concentration used for this study.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos gerais

Em busca de conhecimento, o homem, desde a antiguidade, vem estudando e trabalhando as substâncias encontradas na natureza. Dessa curiosidade natural do ser humano surgiram centenas de misturas que geraram resíduos, e esses, por sua vez, têm sido despejados em diferentes ecossistemas.

A partir da revolução industrial o uso de tais produtos se acentuou, e hoje, segundo a “Chemical Abstract Service”, (uma divisão da “American Chemical Society”), existem aproximadamente 23 milhões de substâncias químicas registradas. Somente uma pequena quantidade dessas substâncias são usadas com frequência vem sendo estudadas sob o prisma dos efeitos tóxicos que provocam nos ecossistemas.

Os ecossistemas aquáticos, em geral, funcionam como os principais receptáculos finais de diferentes tipos de substâncias químicas, mesmo das que não são lançadas diretamente nos corpos de água (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997). É natural acreditar que algumas dessas substâncias se acumulem nas espécies que compõem as cadeias tróficas, podendo ser neutralizadas, modificadas ou biotransformadas, tendo seu potencial tóxico aumentado. Tais substâncias representam um grande potencial tóxico e há uma imensa facilidade de se acumularem nos tecidos da biota, uma vez que, atualmente, altas concentrações podem ser detectadas, principalmente nos sedimentos dos ecossistemas aquáticos (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

Dentre todos os metais lançados no ambiente, o mercúrio é o que tem um maior potencial toxicológico. De todos os metais pesados, somente ele e, em menor escala, o cádmio, foram os responsáveis por graves acidentes de contaminação ambiental. Todos os demais, embora reconhecidamente tóxicos, só foram responsáveis por morte e casos de contaminação aguda geralmente de origem ocupacional (FERNANDES, et. al., 1990), mais restrita.

Embora o mercúrio possa ser encontrado no ambiente, o aumento acentuado nos seus níveis decorre principalmente de ações antrópicas, notadamente aquelas relacionadas às atividades industriais (eletrodeposição,

mineração e metalurgia, tintas, corantes, etc.) e agrícolas (CAVALCANTE, COSTA, TAROUCO, 1990). O uso do mercúrio metálico se faz notar em várias áreas, como na mineração e em consultórios odontológicos (para fazer amálgama) e nos efluentes de muitas indústrias, onde age como catalisador, na obtenção de cloro e soda cáustica (SOUZA, 1990), constituindo-se assim como importante fonte de poluição. Além disso, é usado na agricultura como fungicida e nos hospitais como desinfetante. O rejeito de todas as atividades acima citadas constitui fonte de alto nível de poluição, especialmente dos corpos de água.

Mesmo sendo o mercúrio o 16<sup>o</sup> elemento mais raro da natureza, suas reservas são avaliadas em cerca de 30 bilhões de toneladas. Seu uso indiscriminado tem poluído as águas, ocorrendo freqüentemente desastres ecológicos, muitos deles atingindo diretamente o homem, como ocorreu na baía de Minamata, no Japão, e no Brasil (SOUZA, 1990).

Na cidade de Minamata, a Chisso Química (maior indústria de plásticos do Japão localizada na costa sudoeste da ilha de Kyuschu), operando entre 1920 e 1960, aumentou a fabricação de seu principal produto, o cloreto de vanila, em que eram empregados sais de mercúrio catalisadores: cloreto mercúrico e sulfato mercúrico. O mercúrio, incluindo metilmercúrio e óxido de mercúrio, era lançado nas águas da baía de Minamata como resíduo nos efluentes industriais. Estima-se que tenha lançado ao mar 600 toneladas de mercúrio, chegando a concentração de mercúrio a 2010 mg/Kg nos sedimentos da confluência do canal de descarga da Chisso. A poluição das águas da baía, juntamente com a colaboração de bactérias metanorgênicas resultou, em alta contaminação por metilmercúrio dos moluscos e peixes locais, sendo os destinatários finais os moradores da região, que os ingeria (AZEVEDO, 2003).

Entre 1953 e 1956 surgiram vários casos de uma doença neurológica incomum, numa comunidade de pescadores da baía de Minamata. Somente em agosto de 1956 foi esclarecida a doença como intoxicação por metais pesados oriundos de efluentes industriais. Em outubro de 1959 chegou-se à conclusão de que o agente causal era o metilmercúrio, e em 1960 a fábrica foi levada a modificar seus métodos de descarte. O lançamento de mercúrio inorgânico ocorreu até 1968 e a atividade pesqueira só foi interrompida em 1965 (AZEVEDO, 2003).

Outro fato semelhante aconteceu em 1965, também no Japão, envolvendo as águas doces do rio Niigata, no norte do país. Em ambos os episódios, foram registradas 111 e 121 intoxicações, com dezenas de mortes: 43 e 46. No final de 1983 já eram 1.612 casos confirmados, incluindo 527 mortes. Até 1984 já eram 2.578 casos, com 656 mortes. Casos de ingestão de peixes contaminados ocorreram também em países como Canadá e Estados Unidos (AZEVEDO, 2003).

No Iraque, em 1955 foram registrados inúmeros casos de intoxicação por produtos alimentícios, além de peixes e demais animais aquáticos, o que ocorreu em razão do uso de fungicidas mercuriais empregados no tratamento de sementes que se destinavam ao plantio, não aptas ao consumo humano, mas que foram transformadas em alimentos (AZEVEDO, 2003).

No início da década de 70, com o aumento da produção do ouro, o interesse da sociedade capitalista se voltou para os garimpos, mecanizando-os parcialmente, com a introdução de retroescavadeiras, pás mecânicas, bombas de água potentes, uso de explosivos, entre outros. A transformação desses ambientes se expressou pelo desmatamento, pela poluição dos rios com o mercúrio advindo do processamento do ouro, assoreamento e desvios dos cursos dos rios, e aparecimento de gigantescas crateras, à medida que a frente garimpeira avançou (COUTO, 1990).

O mercúrio resiste a processos naturais de degradação, podendo permanecer por muitos anos sem perder sua toxicidade. Quanto à possibilidade de transformação no ambiente, pode sofrer biomagnificação e bioacumulação. Ao atingir os ambientes aquáticos, as formas inorgânicas do mercúrio podem sofrer reações medianas principalmente por microorganismos que alteram seu estado inicial, resultando em compostos organomercuriais, como o metilmercúrio, mais tóxico que as formas inorgânicas. O metilmercúrio é facilmente absorvido por peixes e outros animais aquáticos, o que provoca a deposição dessa substância química nos tecidos desses animais, a qual se acumula ao longo do tempo, atingindo, na cadeia biológica, concentrações bem maiores do que as originalmente encontradas no ambiente (CÂMARA et. al., 1998 appud AZEVEDO, 2003).

O fenômeno da bioacumulação permite que essas concentrações sejam transferidas de um nível trófico a outro, sofrendo biomagnificação, podendo chegar nos peixes, por exemplo, a níveis, acima dos limites permissíveis para consumo

humano. Pode-se dizer, então, que os organismos aquáticos são ótimos indicadores da presença de mercúrio, e que as concentrações desse metal podem aumentar à medida que o nível na cadeia trófica aumenta (herbívoro, iliófago, onívoro e carnívoro) (EISINK, 1990).

O mercúrio inorgânico ao sofrer o processo de alquilação, ganha lipossolubilidade, condição indispensável para o fácil transporte através de membranas celulares, e assim pode se depositar – bioacumulação - nos tecidos de um organismo (WHO, 1989, appud AZEVEDO, 2003).

A principal via de acesso do mercúrio em humanos é através da ingestão de organismos aquáticos, particularmente peixes, sendo eficientemente organificado à sua forma mais tóxica, na forma de metilmercúrio, no ambiente aquático (LACERDA, 1990). A contaminação de seres vivos por agentes químicos derivados do mercúrio, fatalmente, dentro de um prazo relativamente curto, refletirá em seres humanos, quando da grande probabilidade de ocorrência de toxicidade ambiental em limites indesejáveis (SILVA, et al, 1990).

Muitas das substâncias químicas lançadas no ambiente constituem-se de agentes causadores de mutações gênicas e de aberrações cromossômicas. Algumas dessas substâncias, por exemplo benzenos e pesticidas organoclorados, são chamadas de aneugênicas, pois atuam provocando alterações no número de cromossomos no genoma, devido a erros na distribuição destes durante o processo de divisão celular. Outras substâncias chamadas de clastogênicas induzem quebras e produzem alterações na estrutura dos cromossomos. Essas alterações podem ser detectadas através de metodologias citogenéticas. Portanto, através de testes citogenéticos é possível proceder-se à avaliação dos efeitos mutagênicos de um determinado composto, o que torna esses tipos de testes imprescindíveis nessas avaliações (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

A fim de compreender melhor os efeitos de vários elementos químicos nos ecossistemas, são realizados bioensaios com a utilização de biomarcadores. Estes bioensaios auxiliam no conhecimento das reações biológicas de um xenobionte em um dado indivíduo dentro de uma cadeia trófica. Este conhecimento permite comparações com dados obtidos diretamente do ambiente, ou ainda deduzir se a concentração do agente genotóxico utilizado pode ou não provocar alterações danosas no DNA ou patologias nos tecidos e órgãos.

Vários modelos biológicos podem ser escolhidos para os bioensaios, e os peixes são de grande importância, por participarem em diferentes níveis da cadeia trófica, por sofrerem bioacumulação e por serem detectadas em suas células alterações gênicas e cromossômicas causadas pelos agentes mutagênicos. Peixes são um dos monitores biológicos mais importantes no estudo de poluentes genotóxicos aquáticos (MANA, BANERJEE, GUPTA, 1985).

## 1.2. O mercúrio

Os metais pesados foram definidos por VIARENGO (1989) como sendo um grupo de elementos com peso atômico variando de 63,54 a 200,59, apresentando uma distribuição eletrônica similar na camada externa. A partir daí são excluídos os metais alcalinos terrosos, metais alcalinos lantanídeos e actinídeos (ABEL, 1989).

O mercúrio atualmente está enquadrado na categoria de produtos tóxicos, pois a partir do Decreto nº 97.634, de 10/04/1989, ficou estabelecido que o IBAMA ficaria responsável pelo cadastramento de todas as empresas que operam com a substância mercúrio metálico, tanto na produção e comercialização como por ocasião da importação. Assim, no momento em que o interessado entrar com o pedido de guia de importação, na agência do Grupo CACEX em que estiver cadastrado terá obrigatoriamente que apresentar a comprovação de que está cadastrado no IBAMA (LABORÃO, 1990).

O mercúrio é um metal pertencente ao grupo II B da tabela periódica, junto com o cádmio e o zinco. Descoberto pelos fenícios em 700 a.C., seu símbolo é Hg devido ao nome grego Hydragyrium, que significa prata líquida, por se apresentar na fase líquida a 24 °C (HOFFMAN et. al, 1995). De todos os seus isótopos encontrados na natureza, apenas sete são estáveis. Os isótopos de peso atômico 202, 200 e 199 representam 70% de todo o mercúrio encontrado na natureza, assim o peso atômico médio do mercúrio na natureza é de 200,59 (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997).

Os antigos faziam uso terapêutico do mercúrio, desconhecendo seus efeitos tóxicos. A medicina assíria, entre 668 a.C. e 626 a.C., talvez dois ou três séculos antes, usava compostos de mercúrio para tratar os males dos olhos, ouvidos, pulmões e intestinos e também para forçar contrações uterinas em partos difíceis. Os chineses acreditavam que o mercúrio tinha propriedade medicamentosa para prolongar a vida. Os hindus pensavam que o mercúrio possuía propriedades afrodisíacas. Depois de Cristo, na Grécia, o mercúrio foi usado como unguento medicinal. Os romanos utilizaram como componente de unguentos ou pomadas para o tratamento de diversas doenças da pele, e também em cosméticos, mas logo perceberam que apresentava perigos à saúde e à vida (AZEVEDO, 2003).

O mercúrio ocorre normalmente, em pequenas concentrações, nos vários compartimentos da natureza: hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera. Entre esses compartimentos há um contínuo fluxo de mercúrio (AZEVEDO, 2003).

Os depósitos de mercúrio podem ocorrer em qualquer tipo de rocha (ígneas, sedimentares ou metamórficas). A maior fonte de mercúrio atmosférico é o desgaste natural da crosta terrestre, que soma de 2.700 a 6.000 toneladas por ano. Também podem ser encontrados na atmosfera vapores de mercúrio metálico ou compostos mercuriais orgânicos, sendo as principais fontes os meios terrestres, tais como a evapotranspiração das folhas, o decaimento da vegetação e a degasificação dos sólidos. Os produtos organomercuriais podem atingir a atmosfera através das atividades metabólicas dos microorganismos, das plantas e dos animais. O ciclo se completa através da introdução do mercúrio no ambiente terrestre e aquático devido à deposição natural ou à precipitação atmosférica (BEZERRA, 1990).

Há dois ciclos de transporte e distribuição do mercúrio no ambiente: um global e outro local (Figuras 2 e 3). BOENING (2000) publicou uma revisão geral dos efeitos ecológicos, transporte e destino dos compostos mercuriais em que diz que esses dois ciclos ainda são pouco compreendidos, mas envolvem a circulação atmosférica do dimetilmercúrio formado por meio da ação bacteriana. Assim, os níveis ambientais de dimetilmercúrio dependem do balanço entre a metilação e a desmetilação bacterianas.

O ciclo de alcance global compreende a evaporação do mercúrio pela desgaseificação da crosta terrestre (incluindo áreas de terra e de água como rios e oceanos), a circulação atmosférica de seus vapores e sua precipitação com as chuvas, retomando às terras e às águas.

O ciclo local é favorecido pelas fontes antropogênicas de emissão do mercúrio e depende da metilação do mercúrio inorgânico (OMS, 1978). Outra representação do ciclo do mercúrio influenciado pelo homem é dada na Figura 4.

A natureza tóxica do mercúrio, sua acumulação nos seres vivos e seu deslocamento através da cadeia alimentar atestam sua importância para a biosfera e principalmente para os ecossistemas aquáticos, sendo os organomercuriais muito mais tóxicos do que o mercúrio inorgânico. Os grupos sulfídricos das proteínas são o alvo principal na ação do mercúrio, justificando sua grande citotoxicidade (SOUZA, 1990).

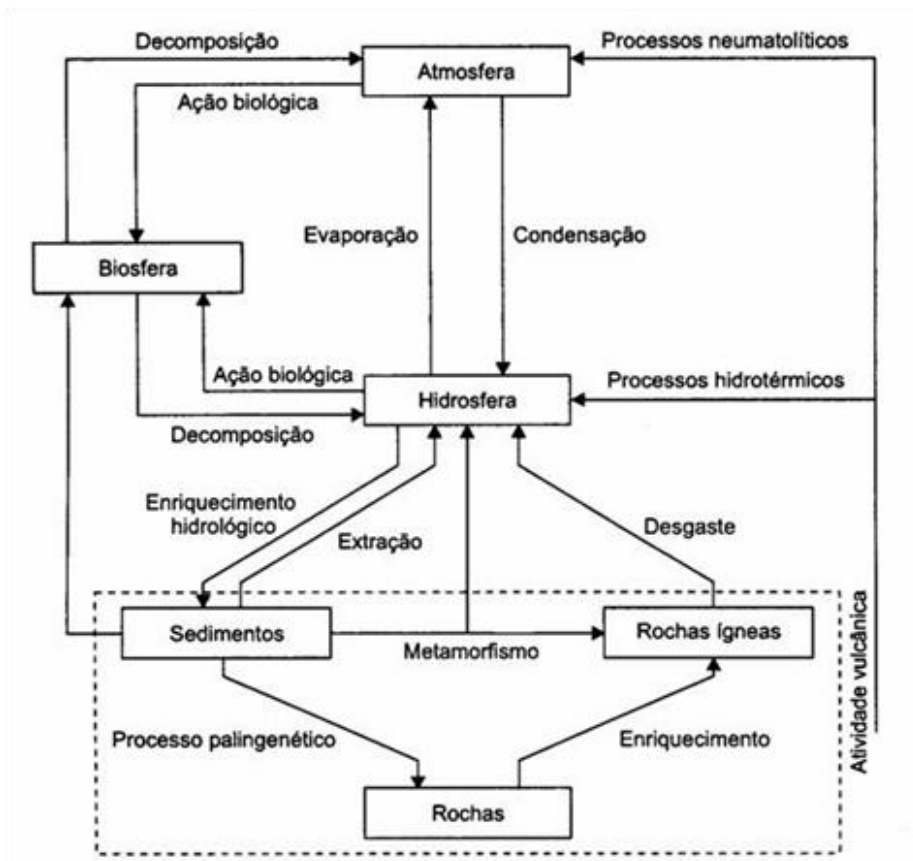


FIGURA 1 – Ciclo natural do mercúrio. Fonte: Sachinath (1986) (appud AZEVEDO 2003)

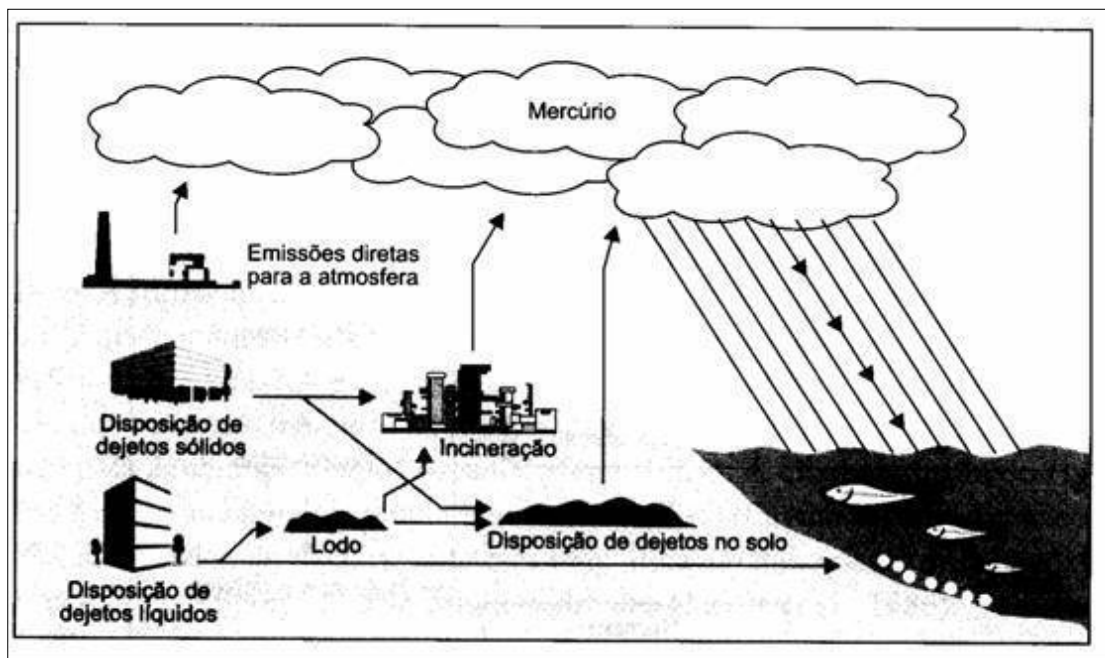


FIGURA 2 – Intervenção antrópica. Fonte: Wisconsin Mercury Sourcebook, 1977 (appud AZEVEDO 2003)

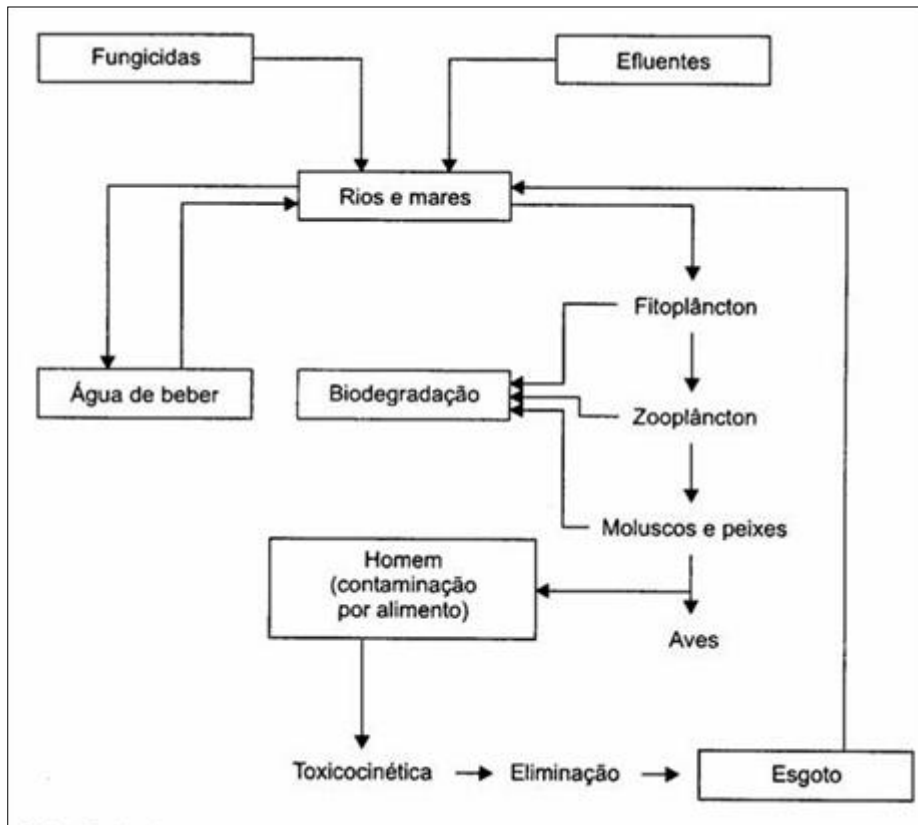


FIGURA 3 – Ciclo do mercúrio na biosfera. Fonte: Modificado de Dix (1981) (appud AZEVEDO 2003)

O mercúrio pode ocorrer na hidrosfera, nos sedimentos, nos solos e na biota em diversas formas químicas, principalmente como  $Hg$ ,  $Hg^{+1}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $CH_3Hg$ ,  $HgS$ . A ação de bactérias catalisa algumas reações do mercúrio, sobretudo as de formação de metilmercúrio, sua forma mais tóxica (RAMOS, COSTA, 1990).

O mercúrio pode existir no ambiente sob inúmeras formas físicas e químicas que controlam seu comportamento. A conversão entre as diferentes formas do mercúrio torna sua distribuição ambiental bastante complexa (LACERDA, 1990).

O mercúrio pode formar complexos com sulfetos e precipitar como  $HgS$ , formando um composto chamado cinábrio o qual foi utilizado como tinta antes de se descobrir o refinamento e a conseqüente extração do mercúrio. Apresenta cor vermelha, tem uma estrutura cristalina hexagonal, formada por cadeias em espiral de átomos de  $-S-Hg-S-$ , constituindo a forma mais estável do mercúrio na natureza (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997).

Informações importantes sobre a toxicidade de metais pesados podem ser obtidas diretamente dos ambientes contaminados, bem como através de estudos de laboratório, sendo que no último caso os estudos vão diferir quanto aos objetivos e

às metodologias de avaliação (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997). Os testes de bioensaios para toxicidade têm sido utilizados em diferentes organismos expostos a determinados contaminantes e sob condições controladas, fornecendo informações importantes do efeito direto sobre o organismo e indiretamente sobre o sistema ecológico (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997).

Apesar das incertezas concernentes à especiação, o ciclo global do mercúrio é envolvido, na maior parte, com as formas inorgânicas. Essas formas não se acumulam em cadeias alimentares exceto em fungos. A mudança da forma inorgânica para a metilada é o primeiro passo crucial no processo de bioacumulação aquática (Environmental Health Criteria 101, 1990). A ameaça para a saúde associada à poluição por mercúrio provém do fato de que algumas bactérias têm a capacidade de converter as substâncias inorgânicas contendo mercúrio em cloreto de metilmercúrio e em dimetilmercúrio. As linhagens de bactérias portadoras de resistência plasmidial contêm genes organizados em operons, responsáveis pelo transporte do mercúrio para o interior da célula, e em seguida pela sua redução a  $Hg_0$ , se o mesmo for inorgânico; no caso de mercúrio orgânico deve haver a ação prévia de uma lise para liberar o radical orgânico da molécula antes da redução a  $Hg_0$  (SOUZA, 1990).

A maioria dos compostos orgânicos de mercúrio é solúvel em água. A solubilidade do metilmercúrio na água varia muito e depende da natureza aniônica do composto (Environmental Health Criteria 101, 1990). As algas possuem concentração de mercúrio muito maior do que a água em que se desenvolveram. Os pequenos crustáceos que se alimentam das algas apresentam concentrações maiores, e os peixes, por sua vez, que se alimentam desses crustáceos possuem concentrações ainda maiores. Um aumento de cerca de 100.000 vezes na concentração do mercúrio foi observado ao longo dessa cadeia de alimentação (RICHEY, GLENN, 1986).

O mercúrio e certos compostos mercuriais têm demonstrado propriedades mutagênicas, pois parecem atuar sobre os microtúbulos das células, os quais estão envolvidos na organização citoplasmática, interferindo na polimerização e provocando contração dos cromossomos na metáfase, retardo na divisão do centrômero e movimento anafásico reduzido (CASSIDY e FURR, 1978, apud AZEVEDO, 2003).

A ação do metilmercúrio na divisão celular, causando C-mitoses (divisão desigual dos cromossomos nas células filhas), foi apontada há algum tempo (RAMEL, 1969, apud AZEVEDO, 2003) revelando que o agente é muito mais potente que a colchicina na produção desse efeito.

Metilmercúrio é capaz de causar danos cromossômicos em culturas de células, segundo estudos com hamsters (KATO, 1976; KRISTOFFERSON, 1975 apud AZEVEDO, 2003). Pode haver indução de perturbações em proteínas histônicas e influências de fatores regulando a atividade de organização nuclear. Metilmercúrio interferiu na expressão gênica de cultura *in vitro* de células da glia em baixas concentrações. A indução da não disjunção e mutações letais recessivas ligadas ao sexo foram encontradas em *Drosophila melanogaster* tratadas com metilmercúrio. A tolerância a mercúrio foi correlacionada com a percepção do mercúrio e não com a velocidade de excreção (Environmental Health Criteria 101 1990).

VERSCHAEVE et al. 1985 (apud AZEVEDO, 2003) observaram, por exposição *in vitro* de linfócitos humanos a  $HgCl_2$  e  $CH_3HgCl$ , a ocorrência significativa de efeito clastogênico e de dissociação de cromossomos acrocêntricos (no normal altamente associados). Os autores afirmam que os efeitos na separação cromossômica não são necessariamente decorrentes da ligação do metal com proteínas do fuso, e que, por exemplo, a ligação e a inativação da RNA polimerase I pode ser outro mecanismo da ação nociva.

Estudos de linfócitos de pessoas que se alimentavam de peixes contaminados e que apresentavam elevados teores de mercúrio sanguíneo revelaram quebra de cromátides, aparição de fragmentos de cromossomos e de cromossomos sem centrômeros, havendo significativa relação estatística entre a freqüência das aberrações e as taxas de mercúrio no organismo. Isso também se verificou em pessoas expostas a outros diferentes compostos mercuriais (KHERA, 1973; MILLER e MILLER, 1979; MILLER et al., 1979; SKERFVING, 1974; SKERFVING et al., 1970,1974; VERSCHAEVE et al., 1976, apud AZEVEDO, 2003).

Todavia, estudando linfócitos do sangue periférico de indivíduos do sexo masculino expostos ocupacionalmente a vapores de mercúrio metálico, MABILLE et al.,1984 (apud AZEVEDO, 2003) não registraram aumento no número de

aberrações cromossômicas dessas células. Segundo os autores, a vigilância da exposição de populações com base no exame citogenético de linfócitos do sangue periférico nem sempre representa bom indicador do dano produzido ao patrimônio genético por um agente químico. A diferença entre esses achados e os de POPESCU et al. 1979 (appud AZEVEDO, 2003) talvez se deva à intensidade da exposição ao mercúrio, posto que as aberrações cromossômicas registradas por esses autores se deram em trabalhadores de indústria de cloro-soda, que exibiam níveis urinários do metal muito superiores, comparativamente.

Assim, de acordo com os achados reportados até o momento, fica evidente que poucos peixes neotropicais têm sido usados como modelo experimental assim como poucos trabalhos vêm investigando os efeitos do mercúrio e seus compostos orgânicos.

### 1.3. Aspectos sistemáticos e ecológicos de *Hoplias malabaricus* (NELSON, 1994).

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Superclasse: Pisces

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Infraclasse: Neopterygii

Divisão: Teleostei

Subdivisão: Euteleostei

Superordem: Ostariophysi

Série: Otophysi

Subsérie: Characiphysi

Ordem: Characiformes

Família: Erythrinidae

Gênero: *Hoplias*

Espécie → *Hoplias malabaricus* (Figura 1).

Os primeiros registros fósseis da Ordem Characiformes são encontrados no fim do Jurássico (CARROLL, 1988). Nessa ordem são encontrados indivíduos com dentes bem desenvolvidos (na maioria carnívoros); nadadeira adiposa geralmente presente; corpo recoberto com escamas (exemplares sem escamas são raros); nadadeira pélvica presente, apresentando de 5 a 12 raios; nadadeira anal de tamanho curto a moderadamente longo, apresentando cerca de 45 raios; linha lateral usualmente curvada, em alguns casos incompleta; dentes faringeanos usualmente presentes mas não especializados; barbos ausentes; nadadeira caudal normalmente com 19 raios; mandíbula superior muito raramente protátil (NELSON, 1994).

Uma das espécies da família Erythrinidae, *Hoplias malabaricus* (traíra), apresenta-se com comprimento variável, podendo chegar a 50 cm de comprimento, e peso de até 1,5 kg (PLANQUETTE; KEITH; LE BAIL, 1996); é um peixe carnívoro, predador, com ampla distribuição geográfica, encontrado em quase todas as bacias, desde a América Central até o rio Colorado (Argentina), apresentando diferentes

áreas de endemismo. A traíra habita ambientes lênticos, e apresenta comportamento territorialista, com hábitos preferencialmente noturnos. Permanece junto à vegetação durante o dia, saindo para caçar durante a noite.

Os indivíduos adultos alimentam-se de peixes, usualmente os dos gêneros *Astyanax*, *Curimatá* e *Aequidens* (SOARES; ALMEIDA; TUNK, 1986). As formas jovens são onívoras, alimentando-se de algas, crustáceos, larvas de insetos e peixes. Têm em sua dieta uma média de 75% de insetos e 25% de pequenos peixes (CASTRO; CASATTI, 1997).

Seus principais predadores no meio aquático são a piranha (*Serrasalmus rhombeus*) e o caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*) (PLANQUETTE; KEITH; LE BAIL, 1996), entre outros.

Um dado interessante relacionado ao hábito predador da traíra se faz notar no movimento de outros peixes ao longo dos rios, pois esses não vão se movimentar apenas devido às correntes e à temperatura, mas sim à presença ou ausência do predador naquelas águas (GILLIAN; FRASER, 2001).



FIGURA 4 – Exemplar de *Hoplias malabaricus*

#### 1.4. Aspectos citogenéticos de *Hoplias malabaricus*

*Hoplias malabaricus* tem ampla distribuição na América Central e do Sul, com uma variedade cariotípica incomum, expressa em diferentes sistemas de cromossomos sexuais.

Por sua ampla distribuição geográfica, acredita-se que o aparecimento de grupos isolados estão relacionados aos habitats das traíras, que ajudariam a explicar suas variações cromossômicas numéricas e/ou estruturais. Essas diferenças fixadas dariam origem a polimorfismos interpopulacionais, podendo, desta forma, ficar caracterizado o isolamento reprodutivo.

Exemplares originados de diferentes sistemas hídricos mostram padrões de cariótipos diversos. Embora diferenças morfológicas, comportamentais ou ecológicas não discriminem / individualizem essas espécies, dados citogenéticos indicam que talvez *Hoplias malabaricus* possa ser um complexo de espécies (BERTOLLO; MESTRINER, 1998).

Algumas populações apresentam sistemas cromossômicos sexuais em que é possível observar extensas regiões de heterocromatina (BERTOLLO et al., 1997). Estudos posteriores vieram confirmar esses achados iniciais, sendo identificados diferentes grupos cariotípicos (citótipos), conforme as características cromossômicas presentes, ou seja, o número e a morfologia dos cromossomos e sistemas de determinação de sexo. Os diferentes citótipos detectados para o complexo *Hoplias malabaricus* podem ser descritos como segue (BERTOLLO et al., 2000).

**CITÓTIPO A:**  $2n=42$  cromossomos para ambos os sexos, sem um sistema diferenciado de cromossomos sexuais.

**CITÓTIPO B:**  $2n=42$  cromossomos para ambos os sexos, com um sistema de determinação sexual do tipo XX/XY.

**CITÓTIPO C:**  $2n=40$  cromossomos para ambos os sexos, sem um sistema cromossômico diferenciado de determinação sexual.

**CITÓTIPO D:**  $2n=40$  cromossomos para as fêmeas e  $2n=39$  cromossomos para os machos, com sistema cromossômico de determinação de sexo múltiplo, do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ .

**CITÓTIPO E:**  $2n=42$  cromossomos, aparentemente sem um heteromorfismo cromossômico. Entretanto, como até o momento apenas exemplares machos foram

analisados, não é possível excluir, em definitivo, a ocorrência de um sistema cromossômico sexual.. Esse citótipo diferencia-se do citótipo A, ambos com  $2n=42$  e sem um sistema de cromossomos sexuais, pela presença de um par cromossômico acrocêntrico característico, de ocorrência rara no gênero *Hoplias*.

**CITÓTIPO F:**  $2n=40$  em machos e fêmeas, sem diferenciação cromossômica sexual. A diferença entre esse e o citótipo C, ambos com  $2n=40$  cromossomos e sem um sistema de cromossomos sexuais diferenciado, reside na morfologia do primeiro par de cromossomos metacêntricos.

**CITÓTIPO G:**  $2n=40$  para as fêmeas e  $2n=41$  para os machos, com sistema de cromossomos sexuais múltiplos do tipo  $XX/XY_1Y_2$ .

### 1.5. As Aberrações Cromossômicas

Cada espécie existente seja ela animal ou vegetal, possui um conteúdo cromossômico que é responsável pela hereditariedade das características próprias do tipo de organismo estudado. Estes conteúdos chamam-se genomas e dão a cada espécie um número característico de cromossomos. Às vezes, porém, podem ocorrer acidentes ambientais ou biológicos, que ocasionam irregularidades na divisão celular, atingindo os cromossomos interfásicos, de modo que pode haver alterações no genoma do indivíduo (BURNS, BOTTINO, 1991)

As alterações do lote genômico são denominadas aberrações cromossômicas (BURNS, BOTTINO, 1991). São encontradas podem afetar uma ou ambas as cromátides e resultam de quebras seguidas de soldura. As quebras resultam em diminuição do tamanho do cromossomo e são identificadas por um fragmento deslocado, ou seja, não alinhado ao resto da cromátide, ou que apresentam uma descontinuidade em relação ao resto do cromossomo, maior que a largura da própria cromátide. Fragmentos muito pequenos, resultam de deleções intersticiais. Muitas quebras se soldam reconstituindo a morfologia original do cromossomo e passam despercebidas. Mas se a posição do fragmento quebrado for alterada, originam-se as inversões pericêntricas e paracêntricas, muitas vezes perceptíveis somente através de coloração especial de bandamento (RABELLO-GAY, RODRIGUES, MONTELEONE-NETO 1991).

Aberrações cromossômicas podem ser divididas em estruturais e numéricas. Nas estruturais podemos encontrar quebras, duplicações, deleções, inversões e transposições e nas numéricas, as poliploidias, haloploidias e aneuploidias (LACADENA, 1996). As aberrações cromossômicas constituem uma fração relevante do dano causado por agentes físicos, químicos e biológicos ao material genético e a análise dessas alterações é imprescindível na avaliação do potencial mutagênico de um composto. A adoção desse teste fornece dados importantes sobre o dano no material genético, além de ter como vantagem a grande experiência e habilidade técnica já existentes em muitos laboratórios. As análises utilizam células *in vitro* ou *ex vivo* obtidas de animais submetidos a uma exposição a agentes xenobióticos. São detectados dois tipos de substâncias mutagênicas, as que

produzem aberrações cromossômicas estruturais e as que interferem na formação do fuso mitótico (RABELLO-GAY, RODRIGUES, MONTELEONE-NETO 1991).

Segundo OBE et al., 2002 (appud FERRARO, 2003) os principais tipos de dano que podem levar ao aparecimento de aberrações cromossômicas estruturais são as quebras em fita dupla no DNA, as quais podem ser originadas através de alguns agentes como a radiação ionizante, certos antibióticos e endonucleases. O autor diz também que a maioria dos agentes genotóxicos e a radiação UV não são capazes de produzir estes tipos de quebra no DNA, mas provocam outras lesões como quebras em fita simples e pontes de dímeros de timina.

Testar a capacidade de agentes físicos, químicos e biológicos em ocasionar aberrações cromossômicas é de uma importância relevante nas estratégias de investigação do potencial mutagênico e/ou carcinogênico destes agentes (OBE et al., 2002 appud FERRARO, 2003).

## 1.6. O Teste de Micronúcleos

O Teste de Micronúcleos *in vivo* foi criado para distinguir citologicamente de forma fácil e rápida quebras ou perdas cromossômicas. O teste de micronúcleos tem vantagens importantes sobre as análises de cromossomos metafásicos, porque é capaz de indicar perdas no conjunto cromossômico assim como distúrbios no aparato do fuso (SCHMID, 1975).

O Teste de Micronúcleos, originalmente desenvolvido com o uso de células de mamíferos, tem sido extensivamente usado em estudos de genotoxicidade de produtos químicos utilizando também outros modelos biológicos (HEDDLE et al., 1983).

Quanto à origem dos micronúcleos (MN), pode-se dizer que esses provêm fragmentos cromossômicos ou de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo de célula-filha durante a divisão celular. São considerados micronúcleos clássicos aquelas estruturas circulares de mesma refringência que o núcleo, não ligadas a esse, e que possuam um tamanho que corresponda de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, a proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (Al-SABTI; METCALFE, 1995). Assim, o ensaio detecta tanto os eventos clastogênicos quanto defeitos no fuso da célula (FERRARI, 1991), hoje conhecidos como aneugênicos.

Dessa maneira, substâncias que provoquem quebras cromossômicas ou ainda afetem os componentes do fuso ou da região centromérica podem ser detectadas pela presença de micronúcleos. Deve-se ressaltar que nem todos os produtos genotóxicos são clastogênicos (HEDDLE et al., 1991).

Segundo HEDDLE et. al. (1983), este teste é potencialmente sensível para quantificar a frequência de anormalidades cromossômicas surgidas nos cromossomos humanos.

No teste de micronúcleos tanto a técnica de preparação quanto a análise do material é mais simples e rápida do que análises cromossômicas. Apesar de que no monitoramento de quebras cromossômicas, o teste do micronúcleo é menos sensível que a análise cromossômica; em contrapartida, inclui efeitos no aparato do

fuso. Todas essas propriedades conferem ao teste do micronúcleo uma alta adequação à rotina de estudos toxicológicos (SCHMID, 1975).

Uma vez que os teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos pode ser usada como medida da atividade clastogênica ou aneugênica de uma substância em ambiente aquático (AL-SABTI; METCALFE, 1995). HOSE et al., 1987 observaram a presença de anomalias adicionais, como a perda da forma elíptica de núcleos e o aparecimento de estruturas Feulgen-positivo no citoplasma. Embora o aparecimento de fragmentos nucleares não se adapte à definição clássica de micronúcleos, são manifestações quantificáveis de genotoxicidade em vertebrados inferiores.

Como a formação dos micronúcleos só pode ser observada após a ocorrência da divisão celular, as frequências desses em um conjunto de células é dependente do tempo que a célula leva para entrar em divisão, do tipo de tecido, da espécie que está sendo usada para o teste e de condições ambientais (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Em todos os ensaios com micronúcleos deve-se levar em consideração a sua ocorrência espontânea.

O teste do micronúcleo constitui-se, então, em um teste de curto prazo, que pode ser realizado tanto em células nucleadas de mamíferos quanto de peixes, com boa sensibilidade para detectar danos nos cromossomos ou no aparelho mitótico originados por xenobiontes. A sua utilização *in vivo* é indicada pelos membros do Mercado Comum Europeu para a análise de substâncias químicas e controle de qualidade (DIRETIVA 92/69/CEE, MÉTODO B12).

## 1.7. O Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, também conhecido por SCG (Single-Cell Gel) ou SCGE (Single-Cell Gel Eletroforesis), consiste em uma técnica capaz de detectar danos de DNA em células individuais. É um teste relativamente novo, mas amplamente aplicado em estudos por ser facilmente manipulável, por ter baixo custo e pelo tempo reduzido para obtenção de resultados. Com esse ensaio é possível detectar danos diretos no DNA (PAX-Y-MIÑO et al., 2002)

Nesta técnica, as células nas quais se deseja verificar o dano causado por agente genotóxico são submetidas à eletroforese em lâminas. O DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto, formando um círculo (os aspectos descritos só são visíveis após a coloração própria da técnica). Caso ocorra dano ao DNA, os fragmentos tendem a migrar mais rapidamente. Sendo o dano muito intenso em uma célula, fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa.

A medida do dano é feita pela relação entre o diâmetro do núcleo sem dano e a extensão das “caudas” dos núcleos com dano (classificados como Classe 0 – nenhum dano, até Classe 4 – máximo de danos).

Além de apresentar alta sensibilidade, essa técnica permite obter resultados a partir de poucas células, e os dados podem ser extraídos de cada célula individualmente (SASAKI et al., 1997).

Originalmente desenvolvido para detectar efeitos genotóxicos em mamíferos, o Ensaio Cometa mostrou-se de grande eficiência na detecção de substâncias genotóxicas em ambiente aquático, ao ser utilizado como biomarcador em dois tipos de moluscos marinhos com concha (*Patunopecten yessoensis* e *Tapes japonica*), (SASAKI et al., 1997).

Em um trabalho pioneiro sobre as propriedades genotóxicas da Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) em peixes, ABD-ALLAH et al. (1999) demonstraram a eficiência do ensaio cometa na detecção de danos ao DNA, utilizando-se de duas espécies de peixes, a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e o catfish (*Ictalurus punctatus*).

Em revisão feita por LEE e STEINERT (2003) com diferentes animais marinhos e dulceaquícolas utilizando o ensaio cometa, destaca que este teste pode dar resposta negativa a uma substância que sabidamente é genotóxica. Neste caso

deve-se levar em consideração que a dose poderia não ter sido suficiente para dar a resposta positiva e/ou o tipo de célula utilizada não foi apropriada para o agente genotóxico. Deve-se ressaltar também a dificuldade de padronização entre os laboratórios e a grande diversidade de ambientes.

## 2. OBJETIVOS

**Avaliar** a genotoxicidade do Mercúrio orgânico na forma de metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) na concentração de  $0,075\mu\text{g/g}$  de peixe, em diferentes tecidos de *Hoplias malabaricus* (Pisces) através:

- 1) da frequência de Aberrações Cromossômicas (AC) em cromossomos metafásicos mitóticos;
- 2) da frequência de Micronúcleos (MN) e de alterações na forma dos núcleos em hemácias de sangue periférico;
- 3) do Ensaio Cometa em núcleos de hemácias de sangue periférico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Organismo utilizado

Os organismos utilizados foram peixes da espécie *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), popularmente conhecidos como “traíra”. Os exemplares foram coletados em uma estação de pesca em Toledo – PR. Esta espécie foi escolhida por ser de fácil adaptação e manutenção nas condições laboratoriais e por ser um predador de hábito alimentar piscívoro, representando assim um nível trófico elevado dentro das cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos.

##### 3.1.2. Coleta e aclimação dos animais

Os peixes foram trazidos da estação de piscicultura em sacos aerados dentro de caixas de isopor. No Laboratório de Bioensaios, os animais foram mantidos em aquários individuais de 30 litros, com água desclorificada, temperatura controlada (em torno de 21<sup>o</sup> C), aeração constante e periodicidade luminosa (12/12 H) por um período de aclimação de 20 dias (Figuras 05, 06, e 07). Estas condições foram mantidas durante todo o bioensaio.

A limpeza dos aquários foi feita a cada cinco dias através da retirada de dois terços da água com um processo de sifonagem para a exclusão de materiais fecais e resíduos. Quarenta e oito horas após cada limpeza era efetuada a alimentação, com exemplares vivos de *Astyanax* (lambaris).



FIGURA 5 – Visão geral do Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular da UFPR.



FIGURA 6 – Disposição dos aquários onde ocorreram os períodos de aclimação e exposição dos animais.



FIGURA 7 – Aquário onde as traíras foram mantidas individualmente. Fotografia tirada no momento em que a traíra engolia sua presa.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Tratamento dos animais

Decorrido o período de aclimação o bioensaio teve início. As traíras foram expostas ao metilmercúrio via alimentação (exposição trófica).

A alimentação foi feita da seguinte forma:

- Um grupo controle com 9 exemplares recebeu como alimento peixes vivos nos quais foi injetado intraperitonealmente água destilada.
- O grupo contaminado, também com 9 exemplares, foi exposto a metilmercúrio através da ingestão de peixes previamente contaminados com esse xenobionte. A dose foi de  $0,075\mu\text{g}$  de metilmercúrio por grama de traíra, calculada segundo OLIVEIRA RIBEIRO (1997).
- Após 70 dias do início da contaminação (13 ciclos de alimentação, um a cada 96 horas), as traíras foram sacrificadas.

### 3.2.2. Sacrifício dos animais e obtenção de material para cada bioensaio

Os peixes foram anestesiados com MS 222 dissolvido na água. Após, com o auxílio de uma seringa heparinizada foi retirado 1 ml de sangue periférico da veia anal de cada animal (Fig. 8), armazenado em tubos de Eppendorf de 1,5 ml, para o Ensaio Cometa. Uma gota de sangue, da mesma seringa, foi colocada em uma lâmina e imediatamente foi feito o esfregaço para o teste do micronúcleo. Foram confeccionadas duas lâminas de cada animal.



FIGURA 8 - Retirada do sangue periférico da veia anal com seringa heparinizada.  
Fonte: FERRARO (2003)

Com o animal ainda vivo anestesiado e colocado sobre uma camada de gelo, para impedir a rápida degradação celular e possível perda de material, foram retirados alguns órgãos para análise morfológica e histológica, como fígado, linha lateral, gônadas e rim, pelo grupo do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Para a análise dos cromossomos foi retirada uma porção de aproximadamente 3 mm<sup>3</sup> do rim anterior e colocada em meio de cultura RPMI 1640 (Fig. 9).

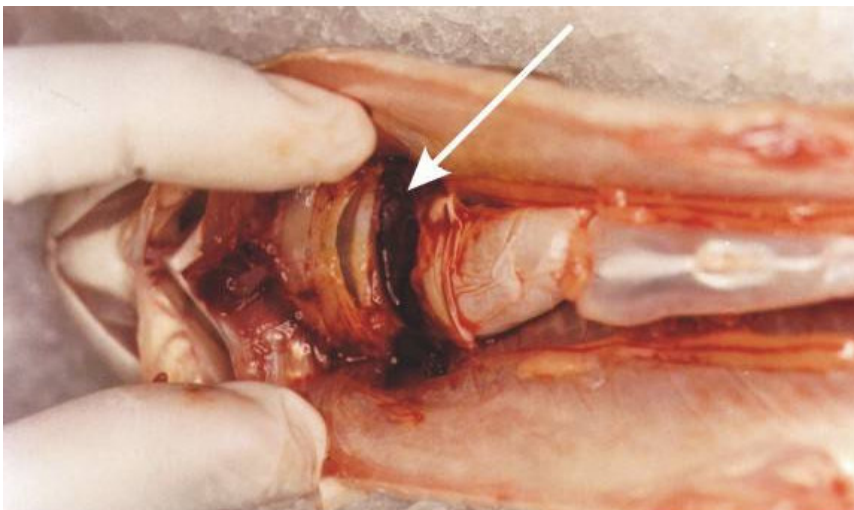


FIGURA 9 – Exposição dos órgãos internos para a retirada do rim anterior, apontado pela seta. Fonte: FERRARO (2003)

### 3.2.3. Análises

#### 3.2.3.1. Metáfases dos peixes do grupo controle e do grupo contaminado

Foi empregada a técnica de cultura de tecidos sólidos de curto tempo (FENOCCHIO et al., 1991), com algumas modificações, que consistem nas seguintes etapas:

- 1) O tecido renal foi colocado em uma placa de Petri contendo 10 ml de meio de cultura RPMI 1640, acrescido de 20% de soro bovino fetal.
- 2) O material foi bem dissociado com o auxílio de duas pinças de ponta fina e em seguida aspergido e expirado com o auxílio de uma seringa de vidro, sem agulha, com a ponta pressionada ao fundo da placa de Petri, para que ocorresse uma melhor desagregação do tecido.

- 3) Após a obtenção de uma suspensão de células, o material foi retornado para os recipientes que continham o meio de cultura.
- 4) A suspensão celular foi incubada em estufa a 27°C por 7 horas.
- 5) Vinte minutos antes do término de período do cultivo, foram acrescentadas, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, três gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente, para interromper a proliferação celular. O frasco foi agitado gentilmente para homogeneizar o material.
- 6) Decorrido esse período, o material foi transferido para um tubo de centrifuga graduado e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm. O sobrenadante foi descartado, e a hipotonização foi feita com 8 ml de solução hipotônica ( $\text{KCl}_{\text{aq.}}$  0,075 M). O material foi ressuscitado gentilmente por 30 vezes, e após, colocado em estufa por 30 minutos a 37°C.
- 7) O fixador foi preparado na hora, usando-se 3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético. Dado o tempo da hipotonização, foram pingadas algumas gotas do fixador em cada tubo, e a solução foi ressuscitada até ficar homogênea. Novamente a solução foi centrifugada por 10 min a 800 – 900 rpm.
- 8) O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 ml de fixador. O material foi ressuscitado por volta de 30 vezes, de forma que a solução se tornasse homogênea; completou-se o volume do tubo com fixador, até 8 ml; novamente o material foi ressuscitado e centrifugado por 10 min a 800-900 rpm.
- 9) A etapa acima foi realizada mais uma vez. Após o tubo ter sido preenchido com o fixador, pela segunda vez, este foi guardado em um freezer à temperatura de -20°C, por 24 h.
- 10) Decorrido esse período, os tubos foram retirados do freezer e o material foi ressuscitado e centrifugado. O sobrenadante foi retirado e o tubo completado até o volume de 1,5 ml. O material foi então transferido para eppendorfs, que foram guardados no freezer à temperatura de -20°C, até a preparação das lâminas.
- 11) O material, após ter sido retirado do freezer (-20°C), foi ressuscitado. As lâminas foram preparadas com duas a três gotas da suspensão celular e secas à temperatura ambiente.

A coloração seguiu a técnica convencional, com o uso de uma solução de Giemsa a 10% em tampão fosfato (pH 6,8), a qual foi colocada sobre as lâminas por um período de 10 minutos. Decorrido tal tempo, as lâminas foram lavadas em água

corrente e secas ao ar. Essa coloração convencional permitiu a análise de Aberrações Cromossômicas como também a análise do cariótipo. Foram analisadas e contadas 50 metáfases de cada animal.

Os cariótipos não foram montados, mas foram capturadas imagens para melhor observação das alterações, permitindo fazer-se um estudo da quantidade de alterações observadas e a qual tratamento cada indivíduo pertencia.

A classificação dos tipos de Aberrações Cromossômicas estruturais segue os critérios de LACADENA (1996), abaixo:

Quebras	Cromossômicas	A quebra envolve duas cromátides
	Cromatídicas	A quebra envolve uma das cromátides
Gaps	Cromossômicas	A quebra envolve duas cromátides
	Cromatídicas	A quebra envolve uma das cromátides

#### 3.2.3.2. Teste de Micronúcleos

Para a análise dos micronúcleos (MN) foi empregada a técnica descrita por HEDDLE (1973), com algumas modificações, que consistem nas seguintes etapas:

- 1) ao se coletar o sangue do peixe, imediatamente foi pingada uma gota em lâmina bem limpa;
- 2) em seguida, com o auxílio de uma lamínula, foi feito um esfregaço, que secou ao ar, em temperatura ambiente;
- 3) após a secagem, a fixação foi feita com etanol absoluto por 1 hora;
- 4) a lâmina foi corada com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato a pH 6,8, por 10 minutos.
- 5) O teste de micronúcleos foi realizado pela análise de 4.000 hemácias por animal, incluindo aquelas com micronúcleos e alterações na forma do núcleo. Só foram consideradas as células com a membrana citoplasmática intacta.

Foram considerados micronúcleos as formas que não excediam 1/3 do tamanho do núcleo e nem eram menores que 1/30 deles, as quais estavam nitidamente separadas, com bordas distinguíveis, da mesma cor e refringência.

### 3.2.3.3. Ensaio Cometa

Essa técnica, descrita por SINGH et al. (1988) com algumas modificações, consiste nas seguintes etapas:

Antes da coleta do sangue:

1. foram utilizadas lâminas limpas com etanol;
2. foi preparada agarose normal 1,5% (300 mg em 20 ml de PBS), a qual foi fervida de duas a três vezes antes do uso;
3. as lâminas limpas foram mergulhadas na agarose quente ( $>60^{\circ}\text{C}$ );
4. após, foi retirada a agarose de um dos lados das lâminas com papel. As lâminas foram colocadas em posição horizontal;
5. as lâminas foram secas em temperatura ambiente (essas lâminas podem ser estocadas por várias semanas);
6. foi preparada agarose 0,5% (100 mg em 20 ml de PBS);
7. essa agarose foi aquecida até se liquefazer em microondas e mantida a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho-maria;

Após a coleta do sangue:

1. o sangue total coletado foi colocado em eppendorf;
2. 15  $\mu\text{l}$  de sangue foram diluídos em 1 ml de soro bovino fetal
3. 15  $\mu\text{l}$  da diluição foi homogenizado com 120  $\mu\text{l}$  de agarose LMP ( $37^{\circ}\text{C}$ );
4. a mistura agarose + sangue foi colocada em uma lâmina e coberta com lamínula e foi acondicionada em refrigerador durante 10 a 20 min;
5. após a adição das células na lâmina foi evitada a exposição à luz direta (irradiação), para a prevenção de danos adicionais ao DNA;
6. as lamínulas foram delicadamente retiradas;
7. as lâminas foram acondicionadas na solução de lise em refrigerador ( $4^{\circ}\text{C}$ ) durante uma hora (as lâminas assim preparadas podem ser estocadas durante períodos de até quatro semanas na solução de lise, caso ocorra precipitação dessa solução as lâminas poderão ser lavadas delicadamente em PBS antes da eletroforese);
8. após o tempo de lise as lâminas foram removidas;
9. as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese na horizontal, preenchendo o máximo possível os espaços vazios; quando necessário, foram completados com lâminas limpas;

10. na cuba de eletroforese foi adicionado o tampão de eletroforese de maneira suave, até cobrir todas as lâminas;
11. a eletroforese foi realizada com a cuba mergulhada em recipiente com gelo a uma temperatura de 4 °C;
12. o DNA foi deixado desnaturando no tampão alcalino por 25 minutos;
13. a corrida de eletroforese foi iniciada com 25 volts e 300 mA e pH>13. Esses parâmetros foram acertados removendo-se ou adicionando-se tampão. A corrida de eletroforese ocorreu por 25 minutos;
14. após a eletroforese as lâminas foram retiradas gentilmente e neutralizadas com 5 ml de solução de lise por 5 min. O procedimento anterior foi realizado por mais duas vezes;
15. as lâminas foram colocadas para secar na posição inclinada;
16. após a secagem as lâminas foram fixadas com etanol, três vezes por cinco minutos. Realizado esse procedimento, as lâminas foram estocadas em geladeira para posterior análise;
17. para coloração foram adicionados 20 µl de brometo de etídeo na lâmina, a qual foi coberta com lamínula. Foi deixada para descansar por cinco minutos e posteriormente analisada.

Para a visualização dos danos do DNA, as lâminas foram observadas em aumento 630x, usando-se microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 515 – 560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas 100 células de cada amostra.

A avaliação foi visual, de acordo com o comprimento da cauda em classes: 0 – sem dano; 1 – dano pequeno; 2 – dano médio; 3 – dano máximo; 4 – células em apoptose (CESTARI et al. 2004). Os escores são obtidos multiplicando-se o número de cometas encontrados pelo valor da classe.

#### 3.2.3.4. Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados através dos testes:

- Qui-quadrado que avalia o grau da contaminação e a resposta de alteração entre os grupos controle e contaminado, não levando em conta o grau da alteração provocada pelo contaminante. Portanto,

com a utilização desse teste apenas, não se consegue observar as diferenças individuais dos animais dentro dos grupos.

- Mann-Whitney que avalia o grau de contaminação e resposta da alteração entre os grupos controle e contaminado, considerando inclusive as diferenças individuais entre os espécimes dentro dos grupos. Esse teste é uma das provas não-paramétricas mais poderosas e constitui uma alternativa extremamente útil de estudo.

Para a realização do teste de Mann-Whitney, aos dados obtidos foram atribuídos escores, que embora representados por números, não têm valor como tais(RABELLO-GAY, RODRIGUES, MONTELEONE-NETO 1991).. Para estes tipos de variáveis não tem sentido o cálculo de médias aritméticas, pois estas nem sempre são as melhores indicações da tendência central dos dados. É o que acontece com a ocorrência de valores aberrantes que arrastam a média em sua direção. Mas sendo preciso efetuar comparações entre grupos experimentais preferiu-se usar também este teste não-paramétrico para duas amostras (CURI, 1998).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos durante a realização do presente trabalho mostraram, em primeiro lugar, que os peixes, neste caso *Hoplias malabaricus*, podem representar um bom modelo experimental, sendo considerados ótimos indicadores de bioacumulação em relação aos efeitos das substâncias genotóxicas. Esta bioacumulação pode ser comparada a do homem, pois tanto um quanto outro são predadores pertencentes a um nível mais elevado na cadeia trófica.

A manipulação e a manutenção dos peixes em laboratório foi satisfatória, pois se chegou a um ambiente onde foi eliminada grande parte dos efeitos externos, como variação de temperatura, luminosidade, pH e tempo de alimentação, eliminando-se ao máximo o risco de erros.

A espécie escolhida para os ensaios garantiu que fosse ministrada a dosagem correta, pois os indivíduos engoliam a presa por inteiro, dando a certeza de que todo o xenobionte era ingerido totalmente via alimentação (exposição trófica – Figura 7).

Cada um dos testes analisou diferentemente o dano causado pelo metilmercúrio, pelo fato de as células se apresentarem em momentos distintos do ciclo celular. As células da porção anterior do rim, que é um tecido hematopoiético nos peixes, foram utilizadas para a análise das Aberrações Cromossômicas. No Teste do Micronúcleo, teoricamente, o eritrócito já teria passado pela divisão celular e no Ensaio Cometa, esta mesmas células estariam em qualquer momento do seu ciclo.

### 4.1. Caracterização citogenética e Aberrações Cromossômicas

De cada exemplar de *Hoplias malabaricus* foram analisadas 50 metáfases. O número diplóide encontrado foi de  $2n = 40$  ( $40, X_1X_1X_2X_2$ ) para as fêmeas e  $2n = 39$  ( $39, X_1X_2Y$ ) para os machos. Esse resultado é concordante com o cariótipo que BERTOLLO et al. (2000) chamaram de CITÓTIPO D. Os autores afirmam que, nessa situação de número diplóide, há um sistema cromossômico de determinação de sexo múltiplo, do tipo  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ .

Foram contadas 450 metáfases do grupo controle e 400 do contaminado, sendo que no segundo grupo não foram obtidas metáfases em um dos peixes.

Dentre as metáfases do grupo controle, 343 apresentaram-se normais e 104 com alteração. No grupo contaminado, 263 metáfases apresentaram-se normais e 137 com alteração. De um total de 850 metáfases, 606 eram normais e 244 apresentaram algum tipo de alteração. A Tabela 1 mostra o resultado das observações das metáfases.

TABELA 1 - Número de metáfases normais e com alterações estruturais em *H. malabaricus* não-contaminadas (controle) e contaminadas com metilmercúrio

	Sexo	Metáfases normais	Metáfases com alterações estruturais	Totais
Controle	Fêmea	39	11	50
	Fêmea	41	9	50
	Fêmea	39	11	50
	Fêmea	41	9	50
	Fêmea	39	11	50
	Fêmea	35	15	50
	Macho	34	16	50
	Macho	33	17	50
	Macho	42	8	50
Total		343	107	450
Contaminado	Fêmea	35	15	50
	Fêmea	35	15	50
	Fêmea	39	11	50
	Macho	28	22	50
	Fêmea	28	22	50
	Fêmea	36	14	50
	Fêmea	32	18	50
	Macho	30	20	50
Total		263	137	400
Totais		606	244	850

Os resultados observados foram tratados estatisticamente com o teste do qui-quadrado, através da montagem de uma tabela de contingência. A hipótese H0 (H1=H2) foi testada, e o resultado mostrou diferença significativa entre os grupos controle e contaminados (Tabela 2), onde  $p = 0,001$ .

A prova de Mann-Whitney também foi realizada para testar a hipótese H0 (H1=H2). Houve diferença significativa entre as amostras (Tabela 3). Aos números de ocorrências de metáfases com alteração foram atribuídos escores. Os postos foram relacionados ao grupo controle (G1) e ao grupo contaminado (G2), a partir dos escores.

TABELA 2 – Teste qui-quadrado para a análise do teste de Aberrações Cromossômicas entre os grupos controle e contaminado (metilmercúrio)

	Controles	Contaminado
Com alteração	107	137
Sem alteração	343	263
X <sup>2</sup> = 10,842		
p = 0,001		

TABELA 3 - Teste Mann-Whitney para o teste de Aberrações Cromossômicas entre os grupos controle e o contaminado (n1 e n2 = 9), (metilmercúrio)

Metáfases com alteração	Escore	Posto	
		G1	G2
8	1	1	-
9	2	2,5	-
9	3	2,5	-
11	4	5,5	-
11	5	5,5	-
11	6	5,5	-
11	7	-	5,5
14	8	-	8
15	9	10	-
15	10	-	10
15	11	-	10
16	12	12	-
17	13	13	-
18	14	-	14
20	15	-	15
22	16	-	16,5
22	17	-	16,5
Totais		R <sub>1</sub> = 57,5	R <sub>2</sub> = 95,5

Foram utilizadas as duas fórmulas abaixo:

$$U_1 = n_1 + n_2 + \{n_1(n_1 + 1)/2\} - R_1 \quad \text{ou} \quad U_2 = n_1 + n_2 + \{n_2(n_2 + 1)/2\} - R_2$$

O menor dos dois valores, U<sub>1</sub> ou U<sub>2</sub>, é aquele cuja distribuição amostral constitui a Tábua K. No caso, o menor valor obtido foi U<sub>2</sub> = 12,5, com p = 0,0237, ou seja, há diferença entre as amostras.

A Figura 10 mostra duas metáfases normais de exemplares fêmea e macho de *Hoplias malabaricus* e a Figura 11 apresenta algumas alterações encontradas, durante as análises das lâminas das preparações do rim anterior.

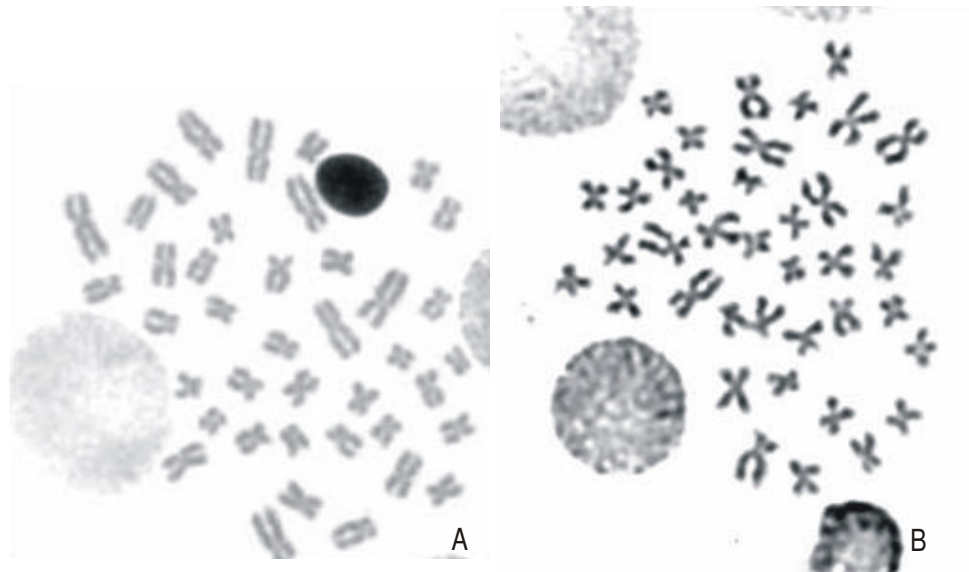
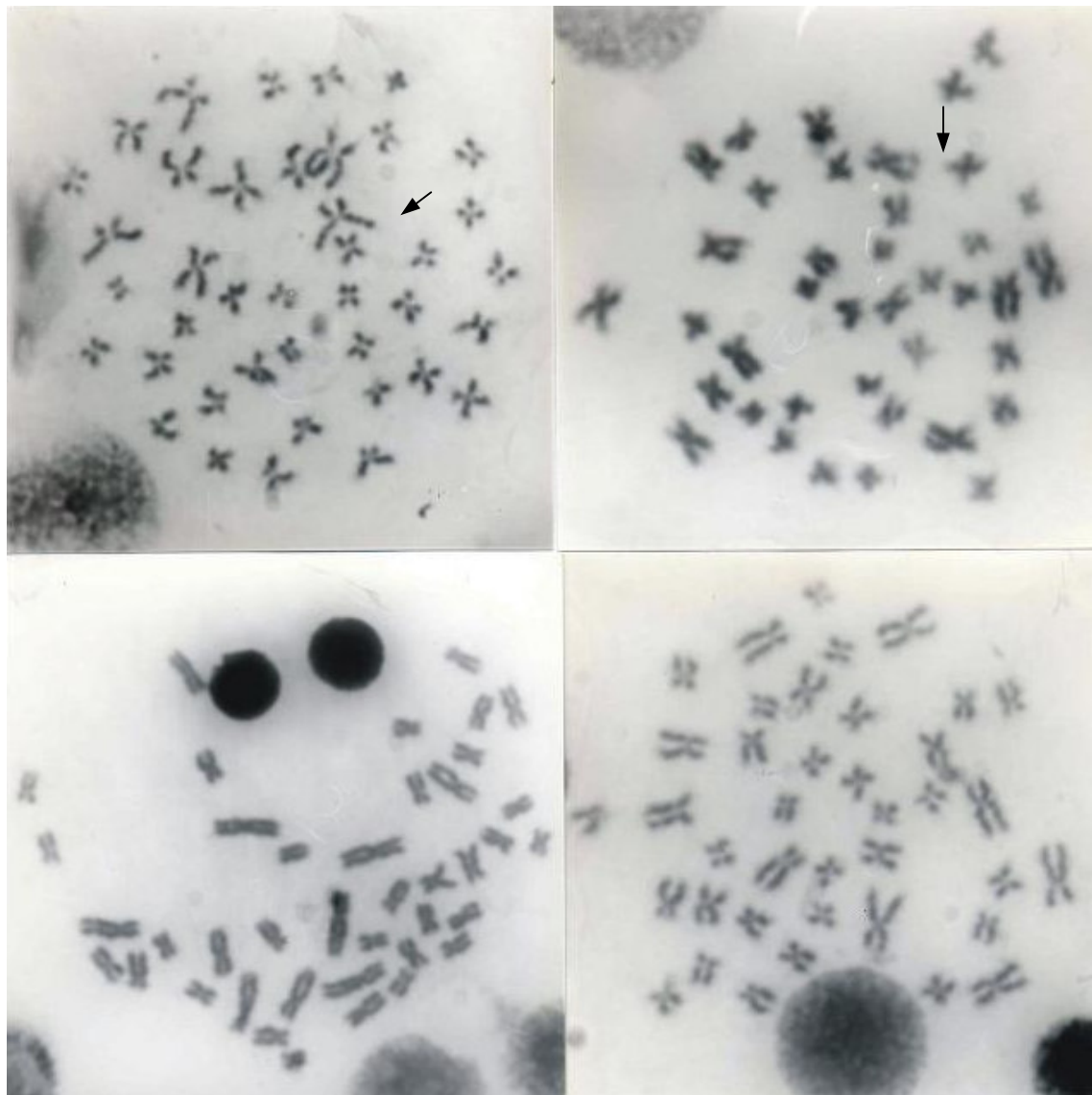


FIGURA 10 – Metáfase normal de A) fêmea  $2n=40$  e de B) macho  $2n = 39$  de *Hoplias malabaricus*.

Muitos trabalhos foram realizados com o intuito de estudar a contaminação e a bioacumulação de metais pesados nos organismos, como por exemplo, na pesquisa realizada por HUSBY, HAUSBECK e MCBEE (1999) em uma mina de carvão abandonada. No referido estudo, foram usados ratos como bioindicadores de contaminação. Os autores comentam sobre a dificuldade de se fazerem estudos de animais *in loco*, pelo fato de não se poderem controlar múltiplas variáveis, metodologia esta que contrasta com o presente estudo. No trabalho citado, assim como no presente, foram contadas 50 metáfases por indivíduo e o teste estatístico usado foi o qui-quadrado. Em virtude de a pesquisa ter sido realizada *in loco*, levando-se em conta a dificuldade de controle das variáveis, o resultado aponta uma incerteza sobre a capacidade de os metais pesados causarem danos cromossômicos nos mamíferos analisados.

No presente trabalho, embora estejamos utilizando peixes e não mamíferos não podemos concordar com esta incerteza, pois segundo nossos resultados o metilmercúrio mostra-se capaz de provocar alterações nos cromossomos. Estas se mostram estatisticamente significantes, o que corrobora com resultados obtidos por OLIVEIRA RIBEIRO (1997) que trabalhou com a mesma concentração ( $0,075 \mu\text{g/g}$ ) em diferentes tecidos de peixes. Além disso, neste trabalho pôde-se obter melhores resultados, provavelmente pelo fato de as variáveis ambientais estarem controladas e temos a certeza de que cada exemplar recebeu a mesma dose do metilmercúrio.

FI  
GU  
RA

11

Me  
táf  
as  
es  
co  
m  
alt  
era  
ção  
es  
ap  
ont  
ad  
as  
pel  
as  
set  
as.ER  
SC  
HA

EVE, et al. (1985) estudaram a capacidade clastogênica (quebras cromossômicas) *in vitro* do  $\text{HgCl}_2$  e do  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ , assim como sua influência na segregação cromossômica. Foram expostos linfócitos de sangue humano periférico em cultura a diferentes concentrações de mercúrio, que variaram de 0 a  $150 \mu\text{M}$  e a diferentes períodos de tempo, que variou entre cultura curta e longa. Contaram-se 100 metáfases por dose e por cultura. Ficou comprovado que os componentes de mercúrio inorgânico, em baixas concentrações, alteram mais a segregação cromossômica do que promovem quebras cromossômicas. Ambos os componentes do mercúrio pareceram aumentar a frequência de aberrações cromossômicas

estruturais e que exposições prolongadas induziram mais aberrações cromossômicas do que pequenas exposições.

Houve algumas diferenças entre o presente trabalho e o de VERSCHAEVE, et al. (1985), pois com as traíras o metilmercúrio foi ingerido pelo indivíduo e não administrado em uma cultura celular, com exposições e tempos diferentes além dos tipos celulares estudados serem outros. Apesar disto, existe uma concordância no sentido de que a presença do mercúrio orgânico causa um aumento na frequência de alterações cromossômicas.

Com o objetivo de desenvolver e avaliar um sistema de monitoramento que usa organismos aquáticos, HAYASHI et al. (1998) realizaram um estudo para determinar a genotoxicidade em água, tanto no campo quanto em laboratório. Nas análises de laboratório foram empregados as avaliações de aberrações cromossômicas e de micronúcleos. Para isso os animais utilizados foram os peixes *Carassius sp.*, *Zacco platypus*, *Leiognathus nuchalis* e *Ditrema temminchi*, nativos do Japão. Foram analisadas células de embrião em crescimento, em contato com água contendo mitomicina C e tricloroetileno e as metáfases observadas mostraram aberrações estruturais.

O presente trabalho está de acordo com HAYASHI et al. (1998) pelo fato de terem sido encontradas aberrações cromossômicas nas traíras após contato com agentes genotóxicos, o que demonstra que organismos aquáticos podem ser bons bioindicadores na detecção de xenobiontes que podem estar presentes no ambiente.

Outros trabalhos que corroboram a idéia de que agentes tóxicos como metais e seus derivados, bioacumulam de uma maneira mais drástica em organismos de topo de cadeia trófica, como a traíra, foram publicados recentemente, mostrando que o teste de aberrações cromossômicas é um bom bioindicador para diferentes contaminantes como TBT (tributilestanho) e chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (CESTARI et al. 2004, FERRARO et al. 2004) e em *Astyanax sp.* (Cipriano et al. no prelo).

Sabidamente o mercúrio tem o poder de bioacumular em tecidos (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997), o que foi constatado no presente trabalho através da análise das aberrações cromossômicas obtidas de células metafásicas mitóticas. Essa constatação foi comprovada com os teste estatísticos que mostram diferenças significativa entre os grupos controle e contaminado.

#### 4.2. Análise do Teste de Micronúcleo Pisceo

Duas lâminas com esfregaço de uma gota de sangue periférico de cada um dos 18 exemplares foram confeccionadas e observadas em microscópio óptico com aumento de 1.000X.

De cada exemplar foram analisadas 4.000 células, nas quais se fez a contagem de micronúcleo e das alterações morfológicas nucleares.

Entre todas as 72.000 células, o número de micronúcleos típicos foi desprezível, dificultando bastante a análise estatística. Por isso, os micronúcleos foram incluídos com as alterações morfológicas nucleares, que apareceram com maior frequência (Figura 12).

Do total das 72.000 células analisadas, uma metade foi do grupo controle e a outra do grupo contaminado. No primeiro grupo, 463 células se apresentaram com núcleos alterados, e no grupo contaminado, 849 células, perfazendo um total de 1.312 que apresentaram algum tipo de alteração (Tabela 4).

Os resultados da Tabela 4 foram tratados estatisticamente com o teste do qui-quadrado através da montagem de uma tabela de contingência. A hipótese  $H_0$  ( $H_1=H_2$ ) foi testada, mostrando diferença significativa entre os grupos controle e contaminado (Tabela 5), onde  $p < 0,001$ .

A prova de Mann-Whitney foi realizada para comprovar se havia diferença entre os grupos controle e contaminado, levando em consideração as diferenças individuais. Nesse caso, testou-se a hipótese  $H_0$  ( $H_1=H_2$ ), e não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 6). Os postos foram atribuídos ao grupo controle (G1) e ao grupo contaminado (G2) com base nos escores.

Foram utilizadas as duas fórmulas abaixo:

$$U_1 = n_1 + n_2 + \{n_1(n_1 + 1)/2\} - R_1 \quad \text{ou} \quad U_2 = n_1 + n_2 + \{n_2(n_2 + 1)/2\} - R_2$$

O menor dos dois valores ( $U_1$  ou  $U_2$ ) é aquele cuja distribuição amostral constitui a Tábua K. No caso, o menor valor obtido foi  $U_2 = 33$ , com  $p > 0,05$ , ou seja, não há diferença entre as amostras.

HOSE, et al. (1987) estudaram taxas de micronúcleos em eritrócitos circulantes em duas espécies de peixes, em áreas contaminadas no sul da Califórnia. Foram contados 1.000 eritrócitos de cada animal. A conclusão é que foi relativamente elevada a presença dessas taxas em comparação com peixes de áreas menos contaminadas. Apesar de os fragmentos compactados do núcleo não

equivalerem à definição clássica de micronúcleo em células de mamíferos, eles são manifestações quantitativas de genotoxicidade em vertebrados inferiores. O teste de micronúcleo písceo, como foi denominado pelos autores, pode ser o indicador mais sensível de contaminação crônica do que aguda à exposição a contaminantes.

TABELA 4 – Número de células com núcleos normais e alterados em *Hoplias malabaricus* (traíras) não-contaminadas (controle) e contaminadas com metilmercúrio

Grupos	Núcleos normais	Núcleos alterados mais micronúcleos	Total
Controle	3.961	39	4.000
	3.977	23	4.000
	3.969	31	4.000
	3.977	23	4.000
	3.833	167	4.000
	3.878	122	4.000
	3.978	22	4.000
	3.980	20	4.000
	3.984	16	4.000
Total	35.537	463	36.000
Contaminado	3.932	68	4.000
	3.786	214	4.000
	3.918	82	4.000
	3.981	19	4.000
	3.962	38	4.000
	3.979	21	4.000
	3.645	355	4.000
	3.966	34	4.000
3.982	18	4.000	
Total	35.151	849	36.000
Totais	70.688	1.312	72.000

TABELA 5 – Teste qui-quadrado entre os grupos controle e contaminado, exposto ao metilmercúrio, para análise do Teste de Micronúcleos

	Controle	Contaminado
Com alteração	463	849
Sem alteração	35.537	35.151
$X^2 = 113,56$ $p < 0,001$		

TABELA 6 - Teste Mann-Whitney entre os grupos controle e contaminado, exposto ao metilmercúrio ( $n_1$  e  $n_2 = 9$ ) para o Teste de Micronúcleo. Aos valores foram atribuídos postos

Células com alteração	Escore	Posto	
		G1	G2
16	1	1	-
18	2	-	2
19	3	-	3
20	4	4	-
21	5	-	5
22	6	6	-
23	7	7,5	-
23	8	7,5	-
31	9	9	-
34	10	-	10
38	11	-	11
39	12	12	-
68	13	-	13
82	14	-	14
122	15	15	-
167	16	16	-
214	17	-	17
355	18	-	18
Totais		$R_1 = 78$	$R_2 = 93$

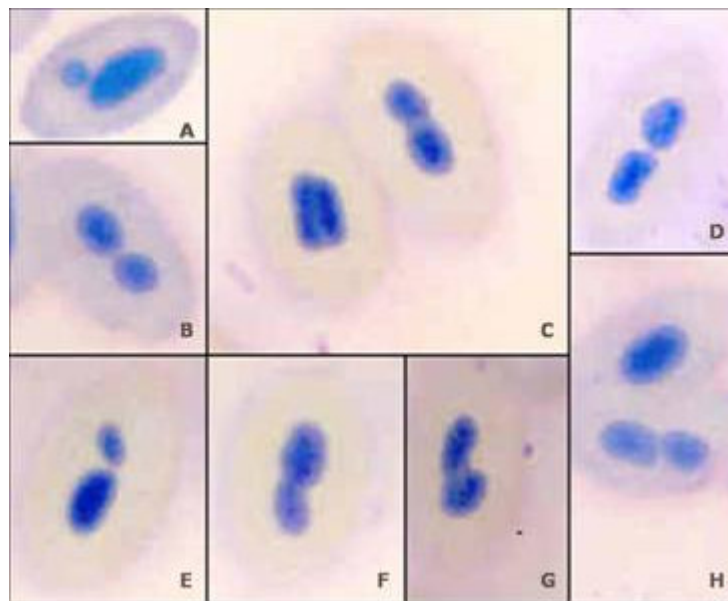


FIGURA 12 – Alterações morfológicas nucleares encontradas nos grupos controle e contaminado, no Ensaio Micronúcleo.

AL-SABTI, METCALFE (1995) utilizaram o Teste de Micronúcleo Písceo para avaliação da genotoxicidade em água. A alimentação é a maior rota de exposição humana a químicos tóxicos, e peixes têm sido reconhecidos como os maiores vetores de transferência da contaminação para os humanos.

CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990), em seus estudos com peixes, verificaram que muito raramente existiam estruturas nucleares supernumerárias no citoplasma dos eritrócitos; para tanto classificaram as alterações como morfológico-nucleares. Existe uma possibilidade para explicar a falta de correlações significantes entre lesões nucleares e as medidas dos contaminantes: a frequência de lesão nuclear nos eritrócitos identificada como micronúcleo ou como análogos genotóxicos não é um indicador válido de exposição para medida de alguns contaminantes particulares, porque alguns desses não alteram as fibras do fuso ou não promovem quebras que resultarão em fragmentos acêntricos.

As lesões nucleares verificadas foram consideradas pelos autores como aberrações. Como são muito mais comuns do que os micronúcleos, concluíram que o Teste de Micronúcleo em peixes pode não ser uma medida sensível de exposição de agentes genotóxicos específicos. É por essa razão que FERRARO (2003) teve dificuldade em tratar estatisticamente somente os dados de micronúcleos ao trabalhar com traíras contaminadas com TBT e Chumbo II mas ao utilizar as alterações morfológicas nucleares, conseguiu constatar diferença entre os grupos controle e contaminados.

Em conformidade com os estudos de CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990), o presente trabalho também encontrou dificuldades em observar a presença de micronúcleos mas não de alterações morfológico-nucleares. Quando as amostras foram consideradas como um todo, o teste do qui-quadrado, apresentou diferença entre os grupos controle e contaminado, mas ao se refinar a avaliação, o teste Mann-Whitney, que trata dos indivíduos como unidades dentro do grupo, não evidenciou diferença. Essa falta de diferença significativa no teste do Mann-Whitney pode ser devido a dois fatores: a) o tamanho da amostra era pequena demais para se chegar a um resultado conclusivo, b) as diferenças entre os indivíduos eram tão grandes que mesmo um teste refinado como este não poderia identificá-las. De fato a amostra realmente não era homogênea, pois os peixes do grupo contaminado eram bem maiores que os do grupo controle. O outro problema que pode ter

influenciado neste resultado foi que não se consegue identificar o sexo da traíra pela morfologia externa, o que ocasionou uma disparidade no número entre machos e fêmeas dentro de cada grupo.

Ainda com relação ao tamanho da amostra, podemos destacar o trabalho de AYLLON, GARCIA-VASQUEZ (2000) que induziram a formação de micronúcleos em duas espécies de peixes, *Phoxinus phoxinus* e *Poecilia latipinna*. Nesse trabalho foram medidos micronúcleos e outras anormalidades nucleares em eritrócitos renais, com o objetivo de contribuir para a padronização do Teste de Micronúcleo para peixes. Foram lidas 1.000 lâminas de eritrócito por animal, em 12 exemplares de *Phoxinus phoxinus* e 16 de *Poecilia latipinna*. Usaram injeções intraperitoniais de colchicina, ciclofosfamida e mitomicina. Finalmente, após a padronização, a sensibilidade diferencial de ambas as espécies foi avaliada pela exposição individual a diferentes doses de cádmio e mercúrio, por 24 horas – um teste agudo. Os testes estatísticos usados para avaliar os experimentos foram Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Após a padronização, os resultados foram diferentes, pois *Poecilia latipinna* é sensível a ambos os metais, enquanto *Phoxinus phoxinus* não é sensível ao mercúrio. Os autores usam uma quantidade um pouco superior de indivíduos o que pode interferir no resultado dos testes estatísticos minimizando diferenças individuais que podem existir, dentro dos grupos. Portanto, podemos pensar que o número de peixes utilizados em nosso experimento pode estar aquém do necessário para obtenção de uma resposta eficiente do teste estatístico.

Um outro teste de Micronúcleos foi executado por SANCHEZ-GALAN, et al. (2001), em células de enguias (*Anguilla anguilla*) coletadas em um rio e aclimatadas em laboratório. Estes peixes receberam injeções intraperitoniais de cádmio e mercúrio na concentração de 1,7 mg metal/kg corpo, o que provocou uma indução de micronúcleos de 2,64 e 2,35 por 1.000 células, respectivamente. Foi usado o teste estatístico de Kruskal-Wallis. Concluiu-se que esses metais pesados são genotóxicos para a espécie e que seu rim é um indicador sensível para monitoramento ambiental.

Ao se comparar com os resultados obtidos com traíra, neste trabalho, podemos destacar algumas diferenças como: a concentração de agente genotóxico ter sido por volta de 2.000 vezes menor do que o utilizado no trabalho acima citado, além da forma de contaminação e do tipo celular estudado. Este último, no caso da

traíra que foi com eritrócitos circulantes, se mostrou ineficiente para a detecção de genotoxicidade com mercúrio, visto que é sabido que este metal bioacumula em tecidos, como dito anteriormente.

MINISSI, CICOTTI e RIZZONI (1996) compararam freqüência de micronúcleos em eritrócito de peixes selvagens, em dois ambientes de riachos, e em peixes reproduzidos e tratados sob condições controladas. A comparação teve por objetivo avaliar o processo do Teste de Micronúcleo para detecção *in situ* de mutagênicos em água doce. Como espécie indicadora foi usado o *Barbus plebejus*, escolhido por causa da sua significância ecológica. No ambiente controle foram utilizados 20 animais e 74 no ambiente contaminado. Amostras de sangue foram coletadas *in loco*, imediatamente após a captura dos peixes, e o processo foi repetido em diferentes intervalos de tempo nos mesmos indivíduos, que posteriormente foram mantidos em ambientes controlados. Não houve diferença significativa na freqüência de micronúcleos entre o grupo controle. Uma freqüência significativamente alta de micronúcleos foi observada nos peixes coletados nos rios poluídos, em comparação aos controles dos peixes do rio não-contaminado. *Barbus plebejus* examinados 50 e 100 dias após a captura apresentaram significativo decréscimo na freqüência de micronúcleos, em comparação com a freqüência observada no momento da captura. O Teste de Micronúcleos em eritrócitos de peixes se mostrou um bioensaio sensível para detecção de poluição em ambientes aquáticos. Portanto a metodologia do micronúcleo se mostra mais eficaz para um animal retirado de um ambiente contaminado ou que sofreu uma contaminação aguda.

Estudos nos eritrócitos de peixes após várias horas do momento da contaminação podem não demonstrar a realidade das alterações que o metilmercúrio pode provocar, pois segundo (HEDDLE et al., 1991), micronúcleos tem uma resposta de curto tempo para substâncias genotóxicas e sua expressão depende da intensidade de exposição à poluição e é provavelmente independente da duração de tal exposição. O teste crônico como foi realizado no presente trabalho, poderá ter resultados satisfatórios se for feito com células de tecidos alvo, como da porção anterior do rim (hematopoiético).

Já com outros tipos de contaminantes a base de metais, como o TBT e o chumbo II, utilizando a traíra e a contaminação crônica por injeção trófica,

FERRARO (2003) avaliando micronúcleos e alterações morfológicas nucleares pôde constatar diferença entre os grupos controle e contaminados com estes agentes.

O teste do qui-quadrado é mais abrangente e menos preciso, pois separa somente os indivíduos controle dos contaminados sem levar em consideração as diferenças individuais, o que levou ao resultado de que os grupos controle e contaminados eram significativamente diferentes em relação ao grau de contaminação e a resposta de alteração do metilmercúrio. Já o teste do Mann-Whitney foi usado para analisar essas diferenças individuais, ou seja, os resultados encontrados em cada animal separadamente foi mais perceptível. A diferença entre os grupos em relação ao grau de contaminação nesse teste não pode ser percebida. Um dos fatos que se pode atribuir à falta de significância no resultado do teste Mann-Whitney é o de que a amostra era pequena e não homogênea. Para uma amostragem maior e mais homogênea, provavelmente seria melhor avaliada a ação do metilmercúrio nas células circulantes dos peixes.

#### 4.3. Análise do Ensaio Cometa

A avaliação foi feita analisando-se visualmente 100 células por indivíduo, de acordo com a intensidade da cauda, distribuídas em cinco classes: 0 – sem dano; 1 – dano pequeno; 2 – dano médio; 3 – dano máximo; 4 – células em apoptose. Procedeu-se ao somatório do número de células identificadas em cada classe e à multiplicação pelo valor da classe.

Na Tabela 7 estão representados os resultados encontrados na análise do Teste Cometa, com os respectivos danos.

Foram analisados 1.800 núcleos, uma metade do grupo controle e a outra do contaminado. Do total, 872 núcleos do grupo controle e 871 do grupo contaminado não apresentaram danos. Foram observados danos em 57 células, 47 delas com dano 1 (25 células pertencentes ao grupo controle e 22 ao grupo contaminado) e 10 com dano 2 (3 células do grupo controle e 7 do grupo contaminado) (Figura 13).

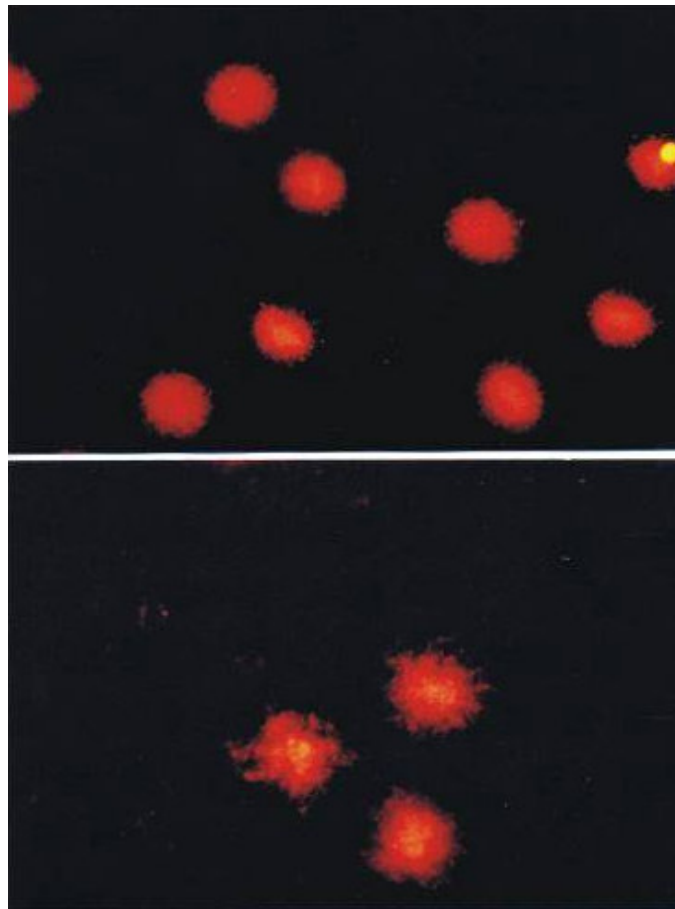


FIGURA 13 – Alterações morfológicas nucleares encontradas nos grupos controle e contaminado, no Ensaio Cometa.

TABELA 7 - Número de núcleos de eritrócitos analisados, normais e alterados, com os respectivos danos, em *Hoplias malabaricus* (traíras) não-contaminadas (controle) e contaminadas com metilmercúrio

Tratamento	Total de células		Classes de cometas				Escores
	Analisadas	Com cometa	0	1	2	3	
Controle	100	1	99	0	1	0	2
	100	3	97	2	1	0	4
	100	3	97	3	0	0	3
	100	5	95	5	0	0	5
	100	0	100	0	0	0	0
	100	1	99	1	0	0	1
	100	3	97	2	1	0	4
	100	8	92	8	0	0	8
	100	4	96	4	0	0	4
Total	900	28	872	25	3	0	
Contaminado	100	3	97	2	1	0	4
	100	6	94	3	3	0	9
	100	2	98	2	0	0	2
	100	1	99	1	0	0	1
	100	8	92	7	1	0	9
	100	4	96	3	1	0	5
	100	1	99	1	0	0	1
	100	2	98	1	1	0	3
	100	2	98	2	0	0	2
Total	900	29	871	22	7	0	

0

Os resultados observados foram tratados estatisticamente com o teste do qui-quadrado, através da montagem de uma tabela de contingência. A hipótese H0 (H1=H2) foi testada, e a diferença entre as amostras não se mostrou significativa entre os grupos controle e contaminado (Tabela 8).

TABELA 8 - Teste qui-quadrado entre grupo controle e grupo contaminado, exposto ao metilmercúrio, para a análise do Teste Cometa

	Classe 0	Classe 1	Classe 2
Controle	872	25	3
Contaminado	871	22	7
$X^2 = 1,792$			
$p = 0,4082$			

A prova de Mann-Whitney também foi realizada, testando-se a hipótese  $H_0$  ( $H_1=H_2$ ), e não houve diferença significativa entre as amostras (Tabela 9). Os postos foram atribuídos ao grupo controle (G1) e ao grupo contaminado (G2), com base nos escores. Foi feita uma soma proporcional para os núcleos alterados que estavam na classe 1 ou 2 de danos nos cometas.

TABELA 9 - Teste Mann-Whitney para análise do Teste Cometa entre o grupo controle e o grupo contaminado ( $n_1$  e  $n_2 = 9$ ), exposto ao metilmercúrio,

Soma proporcional dos Núcleos Alterados	Escore	Posto	
		G1	G2
0	1	1	-
1	2	3	-
1	3	-	3
1	4	-	3
2	5	6	-
2	6	-	6
2	7	-	6
3	8	8,5	-
3	9	-	8,5
4	10	11	-
4	11	11	-
4	12	11	-
4	13	-	13
5	14	14,5	-
5	15	-	14,5
8	16	16	-
9	17	-	17,5
9	18	-	17,5
Totais		82	89

Foram utilizadas as duas fórmulas abaixo:

$$U_1 = n_1 + n_2 + \{n_1(n_1 + 1)/2\} - R_1 \quad \text{ou} \quad U_2 = n_1 + n_2 + \{n_2(n_2 + 1)/2\} - R_2$$

O menor dos dois valores ( $U_1$  ou  $U_2$ ) é aquele cuja distribuição amostral constitui a Tábua K. No caso, o menor valor obtido foi  $U_2 = 37$ , com  $p > 0,05$ , não havendo diferença entre as amostras.

HARTMANN, et al. (2003) fizeram um estudo com o objetivo de elucidar o valor do Ensaio Cometa a partir do Teste de Aberrações Cromossômicas. Foram usadas 13 drogas em células de hamster chinês e em linfócitos humanos. Os resultados demonstraram que ambos os testes apresentam um alto grau de concordância.

Outro estudo para se conhecer o potencial valor do Ensaio Cometa e a medida do DNA no peixe *Limanda limanda* foi realizado por AKCHA, HUBERT e PFHOL-LESZOWICZ (2002). Neste trabalho foram analisadas 50 células de indivíduos fêmeas, 15 adultos e 15 jovens. Buscou-se, *in situ*, estabelecer relação entre contaminação marinha e efeitos genotóxicos, dos espécimens coletados em diferentes lugares no leste do canal inglês (França), conhecidos pela contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e policlorobifenils.

Por meio dos dados do Ensaio Cometa, dois grupos de lugares que pareciam estar harmônicos com os níveis de poluição foram distinguidos. A extensão da quebra na fita de DNA foi mais alta nos adultos do que nos jovens. Do ponto de vista técnico, a sensibilidade do Ensaio Cometa foi afetada pela alta variedade intra-individual. Embora tenha havido diferença qualitativa entre as amostras dos lugares onde foram traçados perfis de DNA, não foram encontradas diferenças significativas para as evidências dos níveis totais de DNA. Os autores concluem que os peixes adultos tiveram uma maior capacidade para transformar contaminantes orgânicos em metabólitos no DNA reativo e sugerem que peixes adultos tenham sido mais adequados para a realização do Ensaio Cometa.

A análise realizada através do ensaio cometa em *Hoplias malabaricus* mostrou alguns problemas com o fato de que os peixes eram jovens e não houve uma padronização quanto ao sexo, tal como foi feito pelos autores acima citados. Esta padronização não foi possível porque *Hoplias malabaricus* não possuem heteromorfismo fenotípico entre os sexos, dificultando a sexagem antes do experimento.

Usando como instrumento os testes Cometa e Micronúcleo, BOMBAIL, et al. (2001) estudaram eritrócitos de peixes da espécie *Pholis gunnellus*. Foi aplicado peróxido de hidrogênio a 25, 50, 100, 200 e 400 micromolar. Para o Ensaio Cometa foram contadas 100 células, e para o Teste de Micronúcleos, 1.000. Houve diferença significativa entre controle e contaminado no Ensaio Cometa; entretanto não houve diferença significativa entre tamanho do corpo e freqüência de micronúcleos.

A conclusão do trabalho acima citado foi que o Ensaio Cometa parece ter um valor limitado no campo da avaliação, por isso outros trabalhos devem ser feitos nas áreas química e física encontradas no ambiente, ou seja, os autores sugerem que o Ensaio Cometa não é um biomarcador conveniente em peixes.

Em uma revisão publicada por LEE e STEINERT (2003), com diferentes tipos de animais marinhos e dulceaquícolas, demonstrou-se as vantagens do ensaio cometa na avaliação de danos no DNA. No mesmo trabalho, comenta-se que quando diferentes métodos são usados para determinar a extensão das quebras nas fitas de DNA, comparações não podem ser feitas facilmente entre estudos em diferentes áreas contaminadas. Um problema é que se a homogeneidade não é alcançada, processos não paramétricos têm que ser usados. Com relação a esse comentário, no presente trabalho não houve homogeneidade entre as amostras, o que nos levou a utilizar o teste estatístico de Mann-Whitney.

Os mesmos autores supra citados, ainda comentam que se no caso do ensaio cometa der resultado negativo, é necessário reavaliar o ensaio. A recontagem deve considerar se o alcance da dose foi suficiente para receber uma resposta, se o método de exposição foi adequado para o tipo de célula usada e se a solubilidade do tóxico foi excedida.

Relacionado a essa questão, podemos inferir que a dosagem de metilmercúrio utilizada nas traíras, via trófica, não foi suficientemente alta para causar danos visíveis nos eritrócitos. Talvez em uma exposição aguda deste agente genotóxico, nesta mesma concentração poderia mostrar danos em uma quantidade maior do que a obtida no tratamento crônico. Além disso, por informações obtidas de tratamentos em peixes neotropicais com metilmercúrio (OLIVEIRA RIBEIRO, 1997), sabe-se que esse é um agente que bioacumula em tecidos, portanto o método utilizado no presente trabalho com células circulantes mostrou-se inadequado para avaliar o efeito genotóxico desse agente.

Em FERRARO (2003), o Ensaio Cometa mostrou diferentes respostas em relação aos contaminantes TBT e Chumbo. Entre o grupo controle e o contaminado com chumbo, houve diferença significativa, mas entre o grupo controle e o contaminado com TBT não foi encontrada diferença, assim como no teste feito para o metilmercúrio na concentração de 0,075 µg. Isto pode levar a supor que o metilmercúrio não provocou danos diretos ao ácido desoxirribonucléico ou às proteínas do sistema de reparo, como é o caso do chumbo no trabalho de FERRARO et al. (2004). Esta idéia se baseia nas informações obtidas de CASSIDY e FURR, 1978 (apud AZEVEDO, 2003), que demonstram que certos compostos

mercuriais têm propriedades mutagênicas, mas atuam sobre os microtúbulos das células, interferindo na polimerização destes.

#### 4.4. Danos causados pelo metilmercúrio em peixes

Além dos testes específicos realizados nesta pesquisa, resultados de trabalhos recentes apontam danos em tecidos de peixe causados pelo uso do metilmercúrio em mineração de ouro e na eliminação de resíduos industriais nos corpos de água.

OLIVEIRA RIBEIRO, et al. (2002) alimentaram peixes com ração que foi imersa em solução aquosa de cloreto de mercúrio e metilmercúrio radioativos.

Nos efeitos da dieta do mercúrio orgânico e inorgânico em 30 dias não houve alteração significativa no tecido do fígado, em uma dose única de mercúrio inorgânico. Entretanto, a dose única de metilmercúrio, apesar da baixa concentração no alimento, teve efeitos severos. Doze horas após a ingestão do alimento, reservas de lipídio do citoplasma do hepatócito foram reduzidos. A quantidade de heterocromatina no núcleo foi aumentada, e as membranas citoplasmáticas foram expostas, comparadas com os controles. Como uma única dose de metilmercúrio pôde induzir danos maiores à estrutura do fígado, é sugerido que a ingestão diária de pequenas doses de metilmercúrio tem um impacto negativo na saúde de peixes em áreas contaminadas. Finalmente, o aumento do metilmercúrio devido à sua absorção preferencial nos peixes pela sua dieta, enfatiza a importância do estudo dos efeitos específicos em baixas doses.

O grau de contaminação por mercúrio em tecido muscular de peixes do Suriname, estudado por MOL, et al. (2000), devido ao pequeno desenvolvimento de minas de ouro, foi investigado pela determinação total da concentração de mercúrio em 318 peixes de água doce, 109 peixes estuarinos e 110 peixes do Oceano Atlântico. A conclusão é que a proporção de níveis de mercúrio em peixes de água doce foi maior em espécies piscívoras do que em espécies não-piscívoras, ambas em águas potencialmente contaminadas. Concentrações de mercúrio em peixes piscívoros de água doce foi significativamente maior em rios potencialmente afetados pela mineração de ouro do que em lugares controles. Os níveis de mercúrio foram significativamente maiores do que em peixes estuarinos.

Portanto com relação ao trabalho aqui apontado, podemos notar que houve diferença significativa entre os animais controle e contaminados quando foram analisados os cromossomos que foram obtidos de um tecido – o rim. Como se sabe que o metilmercúrio bioacumula, ele pode ser detectado em maior quantidade em tecido, e menos em células circulantes. Estes dados podem ser corroborados com trabalhos como o de MABILLE et al., 1984 (appud AZEVEDO, 2003) que não encontraram aumento no número de aberrações cromossômicas em células circulantes em pequenas exposições a vapor de mercúrio, mostrando que o sangue periférico não é um bom indicador para este composto químico.

Outro fator que podemos levar em consideração é a concentração de metilmercúrio utilizada (0,075 µg/g) que precisa ser baixa para provocar alterações detectáveis no DNA das células circulantes, embora seja uma concentração que faz com que as células de tecidos demonstrem a alteração provocada pelo xenobionte como as aberrações cromossômicas (rim anterior) e outras alterações teciduais demonstradas por OLIVEIRA RIBEIRO (1997).

O metilmercúrio se mostrou um xenobionte importante, por causar danos ao material genético dos organismos. Por esse motivo, deve haver uma preocupação maior, tanto dos órgãos administrativos públicos quanto dos responsáveis pelo controle ambiental das indústrias que utilizam esse tipo de material, bem como da população em geral, no sentido de evitar tal contaminação.

O controle e a conservação ambientais hoje é tópico importante em diversos fóruns ao redor do planeta. Toda pesquisa que contempla a melhoria no entendimento e avanço científico, no sentido da conservação do meio ambiente deve ter sua importância reconhecida.

A busca do equilíbrio ecológico harmonizando a ação do homem e a própria sobrevivência no planeta garantem a perpetuação de nosso ambiente e lar, a Terra.

## 5. CONCLUSÕES

- A espécie *Hoplias malabaricus* mostrou-se um bom modelo experimental na avaliação da bioacumulação do metilmercúrio através na porção anterior do rim, o mesmo não acontecendo nas células circulantes.
- O Teste de Aberrações Cromossômicas mostrou claramente através dos testes estatísticos que o metilmercúrio pode bioacumular em tecidos e causar danos em seu material genético.
- O Teste de Micronúcleos não foi conclusivo na avaliação da genotoxicidade do metilmercúrio, não demonstrando concordância entre os testes estatísticos. Provavelmente isso se deveu ao fato de que o Teste de Micronúcleos é feito em células circulantes, o que demonstra citotoxicidade aguda e não crônica.
- O Ensaio Cometa mostrou que não houve diferença entre o grupo controle e contaminado, comprovado com os testes estatísticos, devido ao fato de que esse ensaio demonstra efeitos genotóxicos agudos instantâneos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ALLAH, G. A.; EL-FAYOUMI, R.; SMITH, J. M.; HECKMANN, R. A.; O'NEIL, K. L. (1999). A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the comet assay. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 446, p. 181 – 188.
- ABEL, P. D. (1989). **Water Pollution Biology**, Ellis Howood, Chichester, U.K.
- AKCHA F.; HUBERT F. V. ; PFHOL-LESZOWICZ A. (2002). Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research**, vol 534. p. 21-32.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research – Genetic Toxicology**. v. 343, p. 121-135.
- AYLLON F.; GARCIA-VASQUEZ E. (2000). Induction of micronuclei na ather abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* na mollie *Poecilia latipinna*: na assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, vol 467. p. 177-186.
- AZEVEDO, F. A. (2003) Toxicologia do mercúrio. São Carlos. p. 147-149.
- BERTOLLO, L. A. C.; FONTES, M. F.; FENOCCHIO, A. S.; CANO, J. (1997). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. **Chromosome Research**, v. 5, p. 493-499.
- BERTOLLO, L.A.C.; MESTRINER, C.A. (1998). The X1X2Y Sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses. **Chromosome Research**, v. 6, p. 141-147. 1998.
- BERTOLLO, L.A.C., BORN, G. G., DERGAM, J. A., FENOCCHIO, A. S. E MOREIRA-FILHO, O. (2000). A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Research** 8: 603-613.
- BEZERRA, J. F. M., Estimativas de cargas de mercúrio liberadas para o meio ambiente por atividades industriais – caracterização de fontes. **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro, 1990.**
- BLOCH, M. E. (1974). Der malabarische hecht. In: **Naturgeschichte des Ausländische fische**. Berlin, 149-150.
- BOENING, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, p. 1335-1351.

- BOMBAIL V.; AW D.; GORDON E.; BATTY J. (2001). Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere** vol 44. p. 383-392.
- BURNS, G.W.; BOTTINO, P.J. (1991). **Genética**. 6a ed. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro - RJ.
- CARRASCO K. R.; TILBURY K. L.; MYERS M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, vol 47, p. 2123-2136.
- CARROLL, R. (1988). **Vertebrate paleontology and evolution**. New York : W.H. Freeman, 698 p
- CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L. (1997). The fish fauna from a small forest stream of the upper Parana river basin, southern Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwat.** v.7, p. 337 –352.
- CAVALCANTE, P. R. S.; COSTA, M. L.; TAROUÇO, J. E. F. (1990). Avaliação preliminar dos níveis de mercúrio da porção interna do golfo maranhense. **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro**.
- CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. a.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. (2004) 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*. vol. 27.
- Chemical Abstract Service**. Disponível em: <http://info.cas.org/cgi-bin/regreport.pl>  
acesso em : 19 de abril de 2004.
- COUTO, R. C. de S. (1990). Condições de saúde nos garimpos de ouro da Amazônia. **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro**.
- CURI, P. R. Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas. 2º ed, 1998
- Diretiva 92/69/CEE. Método B12. Disponível em < [http:// europa.eu.int/eur-lex/](http://europa.eu.int/eur-lex/) >  
Acesso em 01 de setembro de 2001.
- EISINK, G. G. J. (1990). **A presença de mercúrio nos ecossistemas aquáticos do estado de São Paulo. Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro**.
- Environmental Health Criteria 101. (1990). Methylmercury. World Health Organization Geneva.

- FERNANDES, R. S.; GUIMARÃES, A. F.; LACERDA, D.; PFEIFFER; WOLFGANG C. (1990). Monitoramento do mercúrio na área do Projeto Carajás. **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro.**
- FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C. G.; DIAS, A. L.; BERTOLLO, L. A. C. (1991). Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v.44, n. 2, p.161-166.
- FERRARI, I. (1991). Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. R.; Monteleone-Neto, R. Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**. p. 107 – 122.
- FERRARO, M. V. M., (2003) Avaliação do efeito mutagênico do tributilestano (TBT) e do chumbo inorgânico (PB II) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: cometa, micronúcleos e de aberrações cromossômicas. **Tese de Mestrado.**
- GILLIAN, J. F.; FRASER, D. F. (2001). Movement in corridors: Enhancement by predation threat, disturbance, and habitat structure. **Ecology**. v. 82, p. 258 – 273.
- HARTMANN A.; PLAPPERT U.; POETTER F; SUTTER W. (2003). Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosomal aberration test. **Mutation Research**, vol 536. p. 27-38.
- HAYASHI M.; UEDA T.; UYENO K.; WADA K.; KINAE N.; SAOTOME K.; TANAKA N.; TAKAI A.; SASDAKI Y. F.; ASANO N.; SOFUNI T.; OJIMA Y. (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, vol 399. p. 125-133.
- HEDDLE, J. A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**. v. 18, p. 187 – 190.
- HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMON, M. F. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research – Genetic Toxicology**. v. 123, p. 61 – 118.
- HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. (1991). Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**. v. 18 p. 277 – 291.
- HOSE, J.E.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DICHL, D. (1987). Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California. **Marine Environmental Research**, v. 22, p.167-176.
- HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. and CAIRNS, J. Jr. (1995) Handbook of ecotoxicology, Lewis Publishers. p. 755

- HUSBY M. P.; HAUSBECK J.S.; MCBEE K. (1999). Chromosomal aberrancy in White-footed mice (*Peromyscus leucopus*) collected on abandoned coal strip mines, Oklahoma, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 18, p. 919-925.
- LABORÃO, J. (1990). Importação, comercialização e controle de mercúrio no país. **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro**.
- LACADENA, J. R. (1996). Citogenética. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense.
- LACERDA, L. D. (1990).; Distribuição e comportamento do mercúrio no ambiente Amazônico. **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro**.
- LEE, R. F.; STEINERT, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**. vol. 544. p. 43-64
- MANA, G. K.; BANERJEE, G.; GUPTA, S. (1985). Micronucleus test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish, *Oreochromis mossambica*. **The nucleus**. v. 28, p. 176-179
- MINISSI S.; CICOTTI E. ; RIZZONI M. (1996). Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, vol 367. p. 245-251.
- MOL J. H.; RAMLAL J. S.; LIETAR C.; VERLOOM. (2000). Mercury contamination in freshwater, estuarine, and marine fishes in relation to small-scale gold mining in Suriname, South América. **Environmental Research**, vol 86. p. 183-197.
- NELSON, J.S. (1994). **Fishes of the world**. New York: John Wiley & Sons Inc, 3ª ed., 600 p.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. (1997). Dinâmica do mercúrio inorgânico (Hg<sup>++</sup>) e o orgânico (CH<sub>3</sub>Hg) e seus efeitos tóxicos em *Trichomycterus zonatus* e *Salvelinus alpinus*. **Tese de Doutorado**.
- OLIVEIRA RIBEIRO C. A.; BELGER L.. PELLETIER È.; ROULEAU C. (2002). Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in the arctic charr (*Salvelines alpinus*). **Environmental Research**, vol 92. p. 217-225.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. **Mercúrio**. (Critérios de salud ambiental, n,1) Genebra, OMS, 1978. 148 p.
- PAX-Y-MIÑO, C.; DÁVALOS, M. V.; SÁNCHEZ, M. E.; ARÉVALO, M.; LEONE, P. E. (2002). Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence base on the comet assay. **Mutation Research**. v. 516, p. 57-61.

- PLANQUETTE, P.; KEITH, P.; LE BAIL, P.Y. (1996). Atlas des poissons d' eau douce de Guyane (tome 1). **Collection du Patrimoine Naturel**, IEGB-M.N.H.N., INRA, CSP, Min. Env., Paris. v.22, p. 166.
- RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed.). (1991). Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**.
- RAMOS, J. F. da F.; COSTA M. Q. (1990) Distribuição do mercúrio em dois garimpos do estado do Pará. **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro**.
- RICHEY, Jr.; GLENN, H.; **Fundamentals of Organic Chemistry. Englewood Cliffs, 1986.**
- SANCHEZ-GALAN S.; LINDE A. R.; AYLON F.; GARCIA-VAZQUEZ E. (2001). Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol 49, p. 139-143.
- SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBAH, S.; TSUDA, SHUJI, T.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. (1997). Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 393, p. 133 – 139.
- SCHMID, W. (1975). The micronucleus test. **Mutation Research Amsterdam**. v.31, p. 915.
- SILVA, A. S.; OLIVEIRA, A. O. F.; GONÇALVES, H. S.; ANJOS, J. R.; AMARAL, N. S.; ESTRELA, V.; DNPM; BARBOSA, A. C.; PONCE, G., A. E.; FERREIRA, G A.; DÓREA, J. G. ; UNB. (1990). Avaliação da poluição por mercúrio nos garimpos de Paracatu-MG. **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro, 1990**.
- SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** v. 175, p. 184 – 191).
- SOARES, M.G.M.; ALMEIDA, R. G; E TUNK, W.T. (1986). The trophic status of the fish fauna in Lago Camaleao, a macrophyte dominated floodplain lake in the middle Amazon. **Amazoniana**. v. IX(4), p. 511 – 526.
- SOUZA, E. C.; Genética molecular e de microorganismos na despoluição do mercúrio (1990). **Seminário Nacional: Riscos e conseqüências do uso do mercúrio, Rio de Janeiro**.

VERSCHAEEVE L.; KIRSCH-VOLDERS M.; HENS L.; SUSANNE C. (1985). Comparative in vitro cytogenetics in mercury-exposed human lymphocytes. **Mutation Research**, vol 157. p. 221-226.

VIARENGO, A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates. **Mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level.**