

WANESSA RAMSDORF

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO DO CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM  
TRAÍRA (*Hoplias malabaricus*) ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO  
PÍSCEO, FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E ENSAIO  
COMETA EM SANGUE E EM TECIDO RENAL**

Monografia apresentada à disciplina BG016 do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

CURITIBA

2005

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à profa. Dra. Marta Margarete Cestari, amiga e orientadora, a quem devo meu ingresso na genética e na mutagênese ambiental. Agradeço também por seus ensinamentos, sua amizade e pelo excelente convívio durante todo esse tempo de laboratório.

Agradeço também ao Marcos V. M. Ferraro, que, através de sua dedicação conseguiu desenvolver os ensaios de mutagênese em nosso laboratório.

Aos membros da banca avaliadora Prof. Dr Roberto Ferreira Artoni e Prof. Marcos V. M. Ferraro.

Aos meus pais, Paulo e Marly, pelo incentivo durante minha formação.

Ao meu irmão e companheiro pela sua enorme paciência.

A Universidade Federal do Paraná pela bolsa de Iniciação Científica.

Aos colegas do Dpto. de Biologia Celular que trabalharam comigo nesse experimento, Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro e João R. M. Costa.

A todos os amigos do laboratório de Citogenética Animal da UFPR: Adriano, Cristiane, Daniel (Pastel), Elizabete, Manoela, Marcos, Maria Claudia, Maria Cristina, Rafael (Polly), Rafael ("Fofó"), Roger, Roxane, Sabine, Taynah e Thaís pelo excelente convívio e pelas muitas conversas na associação dos professores. Vocês, com certeza, fizeram tudo ser muito mais divertido....

Agradecimento especial ao Daniel por seu bom humor e inteligência, por nossas conversas, nossas risadas e nossas loucuras, que tornaram minha vida muito mais feliz. Você é muito especial pra mim.

Agradecimento também especial aos meus amigos para sempre Roger, Rafael, Thaís e Taynah. Vocês são pessoas muito importantes na minha vida.

Aos estagiários, pós graduandos, técnicos e professores do Departamento de Genética.

Ao professor Erasto por sua amizade, incentivo e orientações nas minhas leituras, que mudaram minha maneira de ver o mundo.

Aos amigos do curso de Ciências Biológicas: Shayana, Letícia, Jeane, Edi, Flávia, Mariana, Rodrigo, João, Kléber, Léo, William, Néilson, Beluga, Rose, Gisele, Patrícia, Michele. Agradecimento especial a Shay e a Lê por tudo de divertido que já passamos juntas. Muito obrigada pela amizade de vocês.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABELAS .....	v
RESUMO .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 O chumbo inorgânico.....	03
1.2 Teste do Micronúcleo .....	04
1.3 Estudo da Frequência de Aberrações Cromossômicas .....	06
1.4 Ensaio Cometa .....	09
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo Geral .....	13
2.2 Objetivos Específicos .....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Organismo utilizado .....	14
3.2 Métodos .....	14
3.2.1 Tratamento dos animais.....	14
3.2.2 Bioensaio .....	14
3.2.3 Teste do Micronúcleo Písceo .....	17
3.2.4 Estudo da frequência das Aberrações Cromossômicas .....	17
3.2.5 Ensaio Cometa .....	19
3.2.5.1 Ensaio Cometa com Sangue .....	20
3.2.5.2 Ensaio Cometa com Tecido Renal .....	21
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- <i>Hoplias malabaricus</i> (traíra) no aquário do bioensaio.....	15
FIGURA 02- Disposição dos aquários individuais onde ocorreu o período de aclimatação e exposição das traíras.....	15
FIGURA 03- A foto mostra o ponto junto a nadadeira anal de onde foi colhido o sangue para os ensaios .....	16
FIGURA 04 - A seta indica a localização do rim anterior do qual é retirada uma porção para a cultura de células .....	16
FIGURA 05 - Exemplos de algumas anomalias morfológicas nucleares encontradas nos exemplares coletados.....	25
FIGURA 06- Metáfase de <i>Hoplias malabaricus</i> (2n=42) apresentando quebra cromatídica .....	25
FIGURA 07 - Diferentes classes de cometa.....	26
FIGURA 08- Comparação entre núcleo em apoptose (A) e núcleo íntegro (B).....	26
FIGURA 09- Gráfico comparando os escores obtidos com sangue e tecido renal	29

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01- Micronúcleos e alterações morfológicas nucleares .....	24
TABELA 02 - Totais de células sanguíneas analisadas no Ensaio Cometa por indivíduo com os respectivos tipos de dano encontrados, escores e médias.....	27
TABELA 03 - Totais de células do tecido renal analisadas no Ensaio Cometa por indivíduo com os respectivos tipos de dano encontrados, escores e médias.....	28

## RESUMO

A toxicidade de águas pode ser testada em condições laboratoriais usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras, plantas e organismos aquáticos. Os peixes estão entre os organismos mais indicados para o propósito de biomonitoramento pois, assim como os mamíferos, sofrem bioacumulação, respondem a baixas concentrações de agentes mutagênicos e ativam o sistema do citocromo P450, importante no metabolismo de xenobióticos. Muitos biomarcadores têm sido utilizados como ferramentas para detecção de exposição e para avaliação dos efeitos de poluição por agentes genotóxicos. Esses biomarcadores incluem testes como avaliação de aberrações cromossômicas, quebras e formação de adutos de DNA, Ensaio Cometa e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares. Os metais, assim como uma grande variedade de químicos, são capazes de induzir efeitos carcinogênicos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de genotoxicidade aguda do chumbo inorgânico ( $Pb^{++}$ ) em peixes através da verificação da frequência de micronúcleos piscoes e de alterações morfológicas nucleares em hemácias periféricas e da realização dos ensaios Cometa em células sanguíneas e em tecido renal e frequência de aberrações cromossômicas. Exemplares de *Hoplias malabaricus* receberam injeção intra-peritoneal de diferentes doses de chumbo (0, 7, 21, 63 e 100  $\mu g Pb^{++}/g$  massa corpórea). Os peixes foram anestesiados e sacrificados 96 horas após a aplicação do xenobionte. Imediatamente após o sacrifício foram coletados sangue e tecido renal. O tecido renal foi homogeneizado em tampão TrisHCl-Sacarose (pH 8,6). No ensaio de micronúcleo piscoe, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, através do Teste de Kruskal-Wallis, porém esse resultado não recebeu muita confiabilidade devido ao reduzido número de animais utilizados, o mesmo ocorrendo na verificação da frequência de aberrações cromossômicas. Nos ensaios cometa verificou-se pelo Teste de Kruskal-Wallis que os grupos contaminados apresentaram diferença significativa em relação ao controle, além disso, não foi verificada diferença significativa entre as doses utilizadas. Os ensaios cometa demonstraram ainda, através do Teste de Wilcoxon, que o sangue apresentou maior sensibilidade que o tecido renal, possivelmente em decorrência da contaminação ter sido aguda através da injeção intra-peritoneal. Concluímos assim que o chumbo apresenta atividade mutagênica em *Hoplias malabaricus*, detectada pelos ensaios cometa mesmo quando se trata de exposição em doses baixas e por curto período, além disso, verificamos que o ensaio cometa do sangue periférico é o teste mais indicado para se analisar a contaminação aguda por  $Pb^{++}$ .

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes substâncias químicas produzidas atualmente pela humanidade, apenas uma pequena parcela destas tem sido estudada quanto aos seus efeitos nos seres vivos. Com tantas dessas substâncias chegando ao ambiente, notadamente no ambiente aquático, onde, via de regra, elas mais se concentram, é natural pensar que algumas delas possam estar se fixando nos indivíduos que compõem as cadeias alimentares (FERRARO, 2003).

Vários estudos têm sido efetuados para melhor se compreender o papel de muitos destes elementos e substâncias químicas nos ecossistemas, por exemplo, como e onde ocorrem suas entradas no ambiente, suas interações com os seres vivos, seus efeitos sobre estes e seu prazo de permanência no ambiente, entre outros (FERRARO, 2003).

Muitas das substâncias químicas lançadas ao ambiente constituem-se de agentes causadores de mutações gênicas e de alterações cromossômicas. Algumas destas substâncias são chamadas de aneugênicas, pois atuam provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular dando origem a aneuploidias. Outras são chamadas de clastogênicas, pois induzem quebras e alterações na estrutura do cromossomo, que podem ser detectadas através de estudos citogenéticos. Portanto, tendo um efeito clastogênico ou não, é possível, através de testes citogenéticos, avaliar os efeitos mutagênicos de um determinado composto, o que torna estes tipos de teste imprescindíveis nestas avaliações (RABELLO-GAY et al, 1991).

Muitas substâncias tóxicas como metais pesados e compostos orgânicos podem ser transferidos dos tecidos dos organismos para os seus predadores e chegar a concentrações de maiores magnitudes nos níveis tróficos superiores (DE LEMOS e TERRA, 2003). Estudos sobre a toxicidade de substâncias e elementos químicos se revestem de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação por estes, permitindo avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (PADRANGI et al, 1995).

Genotoxicidade é um termo geral que se refere a alterações na estrutura geral ou na disposição dos cromossomos (clastogenicidade) ou seqüências de pares de

bases do DNA (mutagenicidade) por exposição a agentes tóxicos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse sobre a genotoxicidade em águas e sedimentos. Águas e sedimentos podem ter sua genotoxicidade testada em condições laboratoriais usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras e plantas. Interesses também têm sido focados em testes de laboratório usando organismos aquáticos como anfíbios, moluscos e peixes (MINISSI et al, 1996).

Os organismos mais indicados para o propósito de biomonitoramento são peixes, assim como mamíferos, pois sofrem bioacumulação, são capazes de responder a agentes mutagênicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450, um sistema de enzimas monooxigenases com o grupo heme e com diferentes especificidades por substrato. Estas enzimas desempenham um papel fundamental no metabolismo de substâncias xenobióticas e de compostos endógenos (GOKSOYR et al, 1991). Existe grande quantidade de químicos mutagênicos com alta probabilidade de induzir efeitos carcinogênicos em várias espécies de peixes (MINISSI et al, 1996).

Peixes podem agir como organismos sentinela para indicar o potencial para exposição de populações humanas a substâncias genotóxicas presentes na água para consumo. Alimentos são o modo mais comum para exposição de populações humanas a tóxicos químicos sendo que peixes e crustáceos são reconhecidamente os maiores vetores na transferência de contaminantes aos humanos. Por exemplo, peixes marinhos e crustáceos, que constituem importante fonte de proteínas em muitos países, são muitas vezes contaminados com altas concentrações de metilmercúrio (WHO, 1990) e a indução de danos cromossômicos tem sido encontrada nos linfócitos de pessoas expostas a metilmercúrio devido ao consumo de peixes contaminados (SKERFVING et al, 1974), apesar de que os mecanismos precisos envolvidos nesses processos são até o momento pouco compreendidos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Deve-se destacar, entretanto, a existência de sensibilidade diferenciada entre diferentes espécies de peixes, o que pode impossibilitar comparações entre diferentes dados e futuras generalizações. Por exemplo, SANCHEZ-GALAN (1999) verificou a sensibilidade do *Salmo trutta* ao cádmio e mercúrio com a indução de aumento significativo de micronúcleos após injeção peritoneal, enquanto que a espécie *Phoxinus phoxinus* apresentou-se sensível somente ao cádmio.

O potencial de efeitos genotóxicos em organismos aquáticos expostos a poluição é ainda pouco conhecido, embora a contaminação com elevadas concentrações de PHA (polihidroxialcanoato) em sedimentos no fundo tem sido associada com elevadas prevalências de tumores em peixes habitantes de fundo (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula tem sido investigado em muitos organismos sob diferentes condições (McCARTHY e SHUGART, 1990). Muitos biomarcadores têm sido utilizados como ferramentas para a detecção de exposição e para avaliação dos efeitos de poluição genotóxica. Esses biomarcadores incluem testes como avaliação de aberrações cromossômicas, adutos de DNA, quebras no DNA e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL et al, 2001).

### **1.1 O chumbo inorgânico**

O chumbo, ao contrário do ferro, magnésio e selênio entre outros, é um metal não essencial, altamente tóxico sendo que todos os seus efeitos conhecidos em organismos vivos são deletérios (PAIN<sup>1</sup>, 1995 apud., FERRARO, 2003). Trata-se de um metal de cor branca acinzentada, brilhante, dúctil, macio e muito resistente à corrosão.

Existem duas formas de chumbo inorgânico:  $Pb^{+2}$  e  $Pb^{+4}$ , sendo esta última mais rara. A forma inorgânica é menos tóxica que a orgânica, uma vez que a membrana plasmática apresenta-se permeável ao organometal. No entanto, a quantidade que circula nos ecossistemas é maior de chumbo na forma inorgânica que a forma orgânica (PAIN, 1995 apud., FERRARO, 2003)<sup>1</sup>.

Ambas as formas de chumbo, inorgânico e orgânico, são usados em diversos processos industriais. Compostos de chumbo são utilizados no tingimento e impressão de tecidos, na fabricação de vernizes, na manufatura de pesticidas e reagentes analíticos e na fabricação de explosivos, de vidros coloridos, cristais, fósforos, baterias e tintas (JOHNSON, 1998).

Com o advento da Revolução Industrial aumentou a demanda por este metal. Compostos orgânicos do chumbo, por exemplo, o chumbo tetraetila, foram amplamente utilizados principalmente na forma de antidetonantes na gasolina, pois

permitem que a gasolina seja submetida a altas pressões, dentro do cilindro dos motores, antes de sua explosão (PAIN, 1995 apud., FERRARO, 2003)<sup>1</sup>.

A entrada do chumbo no ambiente pode se dar por duas formas. A primeira, chamada natural, pela ação dos intemperismos sobre os minerais que possuem o chumbo em sua composição, pelo decaimento radioativo ou ainda por atividade ígnea. A segunda, chamada de antropogênica, tem como origem as atividades humanas de mineração, fundição e industrialização (PAIN, 1995 apud., FERRARO, 2003)<sup>1</sup>.

Nos corpos de água a entrada se dá principalmente por descargas industriais diretas ou pela deposição de partículas aéreas. No meio aquático, as maiores concentrações do metal, ocorrem nas águas continentais, principalmente nas proximidades dos grandes centros urbanos (PAIN, 1995 apud., FERRARO, 2003)<sup>1</sup>.

Os animais aquáticos podem absorver o chumbo disponível na água através de sua pele, brânquias ou através da ingestão de alimentos (TAO et al, 1999). Estudos realizados com a espécie de peixe *Pleuronectes platessa* expostos a baixas concentrações de chumbo na água (10 µg/l) relataram a inibição da atividade de enzimas hematopoiéticas; sob altos teores encontram-se relatos de quadros anêmicos, redução na eclosão de ovos e curvatura lateral da espinha; enquanto que em doses letais o chumbo induz aumento na produção de muco, o que resulta na obstrução das brânquias, podendo levar o animal à morte (PAIN, 1995 apud., FERRARO, 2003)<sup>1</sup>.

## 1.2 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido por SCHMID (1975) para células da medula óssea de camundongos e foi adaptado por HOOFTMAN e de RAAT (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Essa modificação originou o que hoje conhecemos por Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO, TILBURY e MYERS, 1990).

O teste do micronúcleo písceo tem sido usado para estimar o nível de exposição a contaminantes em muitas pesquisas, desde os anos 80. Esse teste mede o dano cromossômico estrutural ou numérico e tem sido usado para avaliar genotoxicidade. Esse teste é um indicador recomendado para estudos ambientais tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME et al, 1998). O

consenso geral é que a contagem de micronúcleos durante a intérfase é tecnicamente muito tranqüila e mais rápida quando comparada à contagem de aberrações cromossômicas durante a metáfase (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Segundo AL - SABTI e METCALFE (1995), o teste de micronúcleo em peixes apresenta potencial para detectar a presença de substâncias clastogênicas no meio aquoso, uma vez que os peixes teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos nestas células pode ser averiguada e usada como medida da atividade clastogênica de substâncias no ambiente aquático.

Nem todos os agentes que induzem micronúcleo são clastogênicos. Micronúcleos podem ser formados por uma não disjunção como um resultado de exposição a um "veneno de fuso" (HEDDLE et al, 1991). No entanto, os mecanismos pelos quais os poluentes induzem os micronúcleos em células de peixes e os mecanismos para o efeito interativo entre poluentes em células de peixes não são totalmente conhecidos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

A freqüência de micronúcleos dentro de uma população de células é altamente dependente da cinética da proliferação celular. Essa cinética pode variar de acordo com a espécie de peixe, com o tecido estudado e com as alterações ambientais, entre outros fatores. Dessa forma, não é possível estabelecer um tempo ótimo para formação de micronúcleos após a exposição a agentes genotóxicos sem considerável trabalho para padronizar os procedimentos para os ensaios (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Existem vários ensaios de mutagenicidade e o teste do micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, seguro e sensível, e por não depender da característica cariotípica do animal em estudo (MINISSI et al, 1996). Quando eritrócitos de peixes são usados também não há consumo excessivo de tempo e não há sofrimento dos animais. Por estas razões, o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem se mostrado uma técnica promissora em investigações de mutagênese com causas ambientais (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Micronúcleos são respostas a curto prazo a uma substância genotóxica (HEDDLE et al, 1991), portanto, sua expressão depende da intensidade da exposição a poluição e isso provavelmente independe da duração de tal exposição.

A avaliação das anomalias nucleares e os micronúcleos são ensaios que têm sido bastante utilizados para investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em peixes (AL-SABTI, 1986). Micronúcleos são cromossomos inteiros ou

parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL et al, 2001).

CARRASCO, TYLBURY e MYERS (1990) descreveram e classificaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes em:

- a) *Blebbled*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os blebbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes "vacúolos" apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

Como em qualquer técnica laboratorial, alguns fatores devem ser considerados na aplicação do ensaio com micronúcleos. Este ensaio não é capaz de detectar as não disjunções mitóticas se estas não levarem à perda de cromossomos na anáfase, bem como não será possível detectar aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não originarem fragmentos acêntricos. Desta forma, o teste nestes casos apresenta uma subestimativa e falta de sensibilidade (METCALFE, 1989).

### **1.3 Estudo da Freqüência de Aberrações Cromossômicas**

Como regra geral, a constituição cromossômica dos organismos, tecidos ou células é fixa quanto à forma e número de cromossomos, sendo que variações na forma e número destes, podem ocorrer espontaneamente ou artificialmente. Quando

estas variações afetam a estrutura dos cromossomos, são denominadas de aberrações cromossômicas estruturais, e quando afetam o número de cromossomos de aberrações cromossômicas numéricas (LACADENA, 1996).

Muitos agentes físicos, químicos e biológicos causam mutações gênicas e destes uma grande parte é capaz de produzir aberrações cromossômicas. De uma maneira geral, as aberrações cromossômicas estruturais afetam o ordenamento dos genes ao longo dos cromossomos, ocorrendo a perda ou ganho destes na estrutura cromossômica.

Nas aberrações cromossômicas numéricas podemos encontrar alterações que envolvem a perda de um lote completo de cromossomos (haploidia) bem como o ganho de um ou mais lotes cromossômicos completos (poliploidia). Na aberração cromossômica numérica podemos encontrar ainda alterações nos números de cromossomos que não envolvem diretamente um lote completo de cromossomos, mas sim, perda ou ganho de cromossomos individuais ou de pares de homólogos (RABELLO-GAY et al, 1991; LACADENA, 1996).

A citogenética está sendo muito utilizada para a detecção destas alterações na estrutura e número cromossômicos. As técnicas utilizadas pela citogenética são divididas em três diferentes tipos, segundo AL-SABTI (1986): teste para detecção de trocas entre cromátides irmãs, teste para a detecção de micronúcleos e teste para a detecção de aberrações cromossômicas.

As trocas de cromátides irmãs (TCI) são manifestações citológicas de quebra que ocorrem no mesmo loco das duas cromátides de um cromossomo, seguidas de intercâmbio e reparo (VARELLA-GARCIA, 1991). Esse fenômeno foi descrito primeiramente com a observação da alternância na marcação por auto-radiografia entre as cromátides de alguns cromossomos que haviam se duplicado na presença de timidina tritiada. Com essa técnica, pode-se verificar que os raios X, luz ultravioleta e vários agentes químicos podiam induzir tal fenômeno, mas seu alto custo, a precariedade de sua resolução e o elevado tempo necessário para desenvolvê-lo impossibilitaram sua utilização em grande escala. Somente com as novas técnicas de coloração diferencial das cromátides-irmãs após a incorporação de 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU), um análogo halogenado da timidina, é que o estudo das TCI passou a ser desenvolvido por inúmeros laboratórios (VARELLA-GARCIA, 1991).

Segundo PERRY & THOMSON (1984) (apud. RABELLO-GAY et al, 1991), este teste tornou-se comumente utilizado na avaliação de potencialidade mutagênica, devido a solução das dificuldades técnicas e os achados de que inúmeros agentes clastogênicos podem ser identificados pela capacidade de aumentarem as freqüências de TCI em experimentos.

TCI é considerada um ensaio de grande utilidade para estimar o potencial mutagênico, porque é de execução relativamente fácil e rápida, pode ser aplicada em plantas ou animais e em vários tipos celulares, é sensível a concentrações que não chegam a causar aberrações cromossômicas (PERRY & EVANS, 1975). No entanto, deve ser considerado complemento e não substituto dos outros ensaios para a avaliação de clastogenicidade, pois não fornece estimativa qualitativa ou quantitativa.

As aberrações cromossômicas constituem uma fração relevante do dano causado por agentes físicos, químicos e biológicos ao material genético. Aberrações encontradas podem afetar uma ou ambas as cromátides (cromatídicas ou cromossômicas) e resultam de quebras seguidas ou não de soldadura. As quebras são identificadas por um fragmento deslocado, ou que apresenta uma descontinuidade em relação ao resto do cromossomo. A posição do segmento quebrado pode ser alterada ao se soldar no mesmo cromossomo, dando origem às inversões pericêntricas e paracêntricas, muitas vezes só distinguíveis através de colorações diferenciais (bandeamentos cromossômicos).

Para a análise das aberrações cromossômicas são utilizadas células em divisão fixadas na fase de metáfase (RABELLO-GAY et al, 1991). Este ensaio, apesar de comumente utilizado em avaliações de genotoxicidade, requer experiência e perícia na preparação do material para se obter metáfases com qualidade, que possibilitem uma boa análise (KESHAVA et al, 1995).

Radiações e agentes genotóxicos induzem aberrações cromossômicas nos seres vivos, sendo que a ocorrência das aberrações cromossômicas é dependente da intensidade ou concentração destes agentes, bem como, do tipo celular em estudo e do momento do seu ciclo celular onde ocorreu a exposição (OBE et al., 2002).

Muitos dos danos causados no DNA se revelam no aparecimento de aberrações cromossômicas. Os principais tipos de dano, que podem levar ao aparecimento de aberrações cromossômicas estruturais, são as quebras em fita

dupla no DNA. A ocorrência das quebras em fita dupla, bem como as aberrações cromossômicas podem ser letais para as células. Reparos incorretos destas quebras podem ocasionar mutações e rearranjos cromossômicos e com isto dar origem a transformações oncogênicas (LACADENA, 1996; OBE et al, 2002).

Testar a capacidade de agentes físicos, químicos e biológicos em ocasionar aberrações cromossômicas tem um papel importante nas estratégias de investigação do potencial mutagênico e/ou carcinogênico destes agentes. As aberrações cromossômicas são uma pequena fração de uma grande quantidade de mudanças no DNA cromossômico e refletem a enorme plasticidade do genoma (OBE et al, 2002).

O método de avaliação de dano cromossômico aplicado em peixes tem sido o teste de micronúcleos, sendo utilizados em alguns poucos casos as aberrações cromossômicas e o teste de troca de cromátides irmãs. O teste de aberrações cromossômicas tem sido usado em alguns casos neste grupo de animais, porém a maior limitação é representada pelo alto número e o pequeno tamanho dos cromossomos de peixes (CIPRIANO et al, 2004).

FERRARO et al (2004) e CESTARI et al (2004), ao realizarem bioensaios com traíras (*Hoplias malabaricus*) mostraram o poder genotóxico dos metais chumbo (PbII) na dose de 21µg o mesmo acontecendo com lambaris (*Astyanax*). CIPRIANO et al (2004) estudou a frequência de aberrações cromossômicas em *Astyanax* expostos ao TBT (tributilestanho) na dose de 0,3 mg/kg em exposições de 19 e 37 dias e observou diferentes anomalias cromossômicas, como quebra de uma ou de duas cromátides e fragmentos acêntricos.

#### 1.4 Ensaio Cometa

Nos últimos anos, tem crescido o interesse científico no ensaio Cometa ou eletroforese em gel para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (BELPAEME et al, 1998). O ensaio investiga danos no DNA (simples, dupla-fita) ao nível celular individual através da medição da migração em gel do DNA de células depois de uma corrida eletroforética (SINGH et al, 1988). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL et al, 2001).

O consenso geral atual é que o ensaio é simples, rápido e sensível. Contudo, uma das maiores críticas da técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica (BELPAEME et al, 1998).

São necessários métodos sensíveis adequados para se avaliar o impacto crônico de contaminantes nos organismos. O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará de forma homogênea formando um círculo. Caso o DNA pesquisado tenha dano, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, de modo que, na eletroforese, os fragmentos menores migrem mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores. Ocorrendo um dano intenso no material celular, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, originando a figura típica de um cometa (OLIVE et al, 1990).

Ao contrário de outros tipos de ensaio como o dos micronúcleos, de aberrações cromossômicas ou de trocas de cromátides irmãs que necessitam de células em proliferação para sua viabilidade, o ensaio cometa não necessita desta condição, podendo ser utilizado em, virtualmente, qualquer tipo de célula (PADRANGI et al., 1995).

Diversas publicações provam que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de mutagênicos em peixes. A resposta pode, é claro, depender das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula, do mutagênico e da duração da exposição (BELPAEME et al, 1998).

O ensaio cometa pode ser uma ferramenta interessante para monitoramentos na demonstração de genotoxicidade de exposições e para investigar os impactos na integridade do dano no DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental. Nesse sentido, 3 principais vantagens foram identificadas: (i) qualquer tipo de tecido com células nucleadas pode ser usado, (ii) são necessárias pequenas quantidades de amostras, (iii) o ensaio é rápido, sensível e barato (BELPAEME et al, 1998).

Antes destes aspectos, deve-se considerar os mecanismos de reparo próprios do DNA que podem estar atuando antes da análise do material. Ressalta-se, porém, que sob esse aspecto de reparo do DNA, os organismos aquáticos tem sistemas mais lentos que os mamíferos (ESPINA; WEISS, 1995).

Até o presente momento, os resultados de biomonitoramento usando o ensaio cometa e o teste do micronúcleo para detectar efeitos de genotoxicidade em sangue, fígado, brânquia e rim de peixes estão sendo avaliados (BELPAEME et al, 1998).

O ensaio cometa é habitualmente realizado com eritrócitos pois estes são facilmente obtidos por métodos não destrutivos e não necessitam do passo adicional de isolamento, porém outros tecidos também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes podem ser muitas vezes tecido-específicos.

Os tecidos mais pesquisados, além do tecido sanguíneo, são fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo, brânquias, devido ao seu contínuo contato com a fase aquosa e o tecido renal, o tecido produtor de sangue em peixes (BELPAEME et al, 1998). O sangue também apresenta a vantagem de apresentar em sua composição aproximadamente 97% de eritrócitos nucleados e apenas cerca de 3% de leucócitos, o que confere alta homogeneidade ao tecido (MITCHELMORE, 1998).

Ensaio realizados com o mutagênico EMS (etilmetanosulfato) mostraram resultados estatisticamente significantes para diferentes tecidos com o ensaio cometa, verificando que os tecidos pesquisados (sangue, fígado, brânquias e rim) são sensíveis a esse mutagênico. Os diferentes tecidos mostraram um padrão de resposta similar nos experimentos realizados porém foram realizadas as seguintes constatações: maior sensibilidade em células de brânquias, as respostas das células do fígado foram sempre as menores e não foi observada tendência clara em células do rim (BELPAEME et al, 1998).

Como o Ensaio Cometa analisa as células individualmente, estas têm que ser individualizadas, da forma que existe uma certa limitação no sentido de separar as células. As células devem então ser separadas por processos de fragmentação ou através da aplicação de enzimas. Estas células devem ser convenientemente separadas por meios que não as danifiquem mas que permitam sua individualização. No caso de células sanguíneas estas podem ser diluídas em soro bovino fetal ou em solução fisiológica. Qualquer que seja o meio a ser utilizado, todo o processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos adicionais ao DNA possam ocorrer (FERRARO, 2004).

Uma vez que substâncias genotóxicas são freqüentemente tecido-específicas, a vantagem do ensaio cometa torna-se evidente, pois permite avaliar os danos do

contaminante sobre um tecido específico, porém ressalta-se que o tecido pesquisado deve ser antes adequadamente desagregado.

Trabalhos realizados com camundongos contaminados com agente conhecidamente genotóxico (ENU, etilnitrosurea), verificaram que a técnica de homogeneização foi a mais eficiente para a dissociação celular. Estes autores trabalharam com a homogeneização de vários órgãos (fígado, pulmão, baço, rim e medula óssea) em uma solução de homogeneização com 0,075 M NaCl e 0,024 M Na<sub>2</sub>EDTA e pH 7,5. As porções dos órgãos foram homogeneizadas em homogeneizador Potter. Após a homogeneização, o homogenato foi então centrifugado e os núcleos obtidos foram então levados para a realização do ensaio cometa (SASAKI et al, 1997).

O papel da lise no ensaio cometa é o de remover os conteúdos celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de uma pequena quantidade de proteínas não histônicas. Porém, quando colocado na solução de eletroforese, com pH maior que 13, a espiralização do DNA começa a relaxar a partir dos pontos de quebra da fita, permitindo, dessa maneira, que os mesmos sejam revelados pela eletroforese na seqüência do teste (YENDLE et al, 1997).

As condições de pH da solução de lise e do pH do tampão de eletroforese onde ocorre o relaxamento da molécula de DNA influenciam no tipo de dano a ser visualizado, bem como nas características do cometa obtido. Sob condições neutras (pH 7,5) os cometas apresentam caudas mais densas enquanto que sob condições alcalinas (pH>10) são mais dispersas (KLAUDE et al., 1996)

O ensaio cometa realizado sob condições alcalinas permite a detecção de quebras em fita simples do DNA (OLIVE et al., 1992). Estima-se que com cerca de mais ou menos 200 quebras na fita de DNA de uma célula o teste mostre sua sensibilidade. Este número de quebras é muito menor do que qualquer outro método para detectar danos ao DNA existente atualmente (ROJAS et al, 1999).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de genotoxicidade aguda do chumbo inorgânico ( $Pb^{++}$ ) em diferentes doses utilizando *Hoplias malabaricus* como bioindicador.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a frequência de micronúcleos e a frequência de alterações morfológicas nucleares em hemácias periféricas através do teste do micronúcleo písceo;
- Estudar a frequência de aberrações cromossômicas;
- Realizar o ensaio Cometa em células sanguíneas e em células do tecido renal, e comparar os resultados obtidos;
- Testar uma metodologia e uma solução de homogeneização para a realização do ensaio cometa com células teciduais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Organismo utilizado

*Hoplias malabaricus* foi a espécie escolhida por ser resistente e sobreviver bem em aquários, além de ser uma boa representante de elevado nível trófico na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos. Para análise de genotoxicidade, a traíra é um excelente bioindicador por apresentar hemácias nucleadas (comum aos peixes), possuir poucos cromossomos ( $2n=40/42$ ) e de tamanho médio, razoável para análise de aberrações cromossômicas.

#### 3.2 Métodos

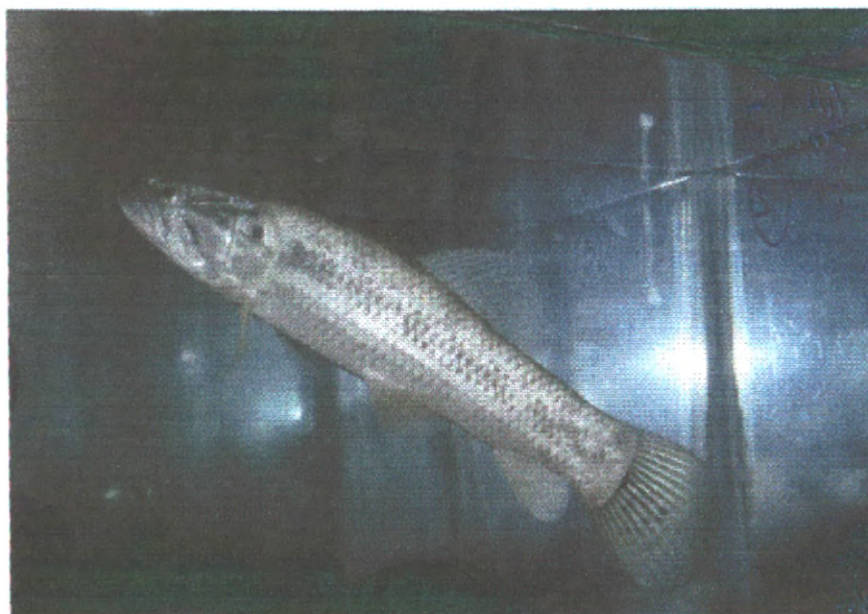
##### 3.2.1 Tratamento dos animais

Os exemplares de *Hoplias malabaricus* (Figura 01) foram expostos ao chumbo ( $Pb^{++}$ ) através de injeção intra-peritoneal de diferentes doses (7, 21, 63 e  $100\mu g Pb^{++}/g$  massa corpórea).

##### 3.2.2 Bioensaio

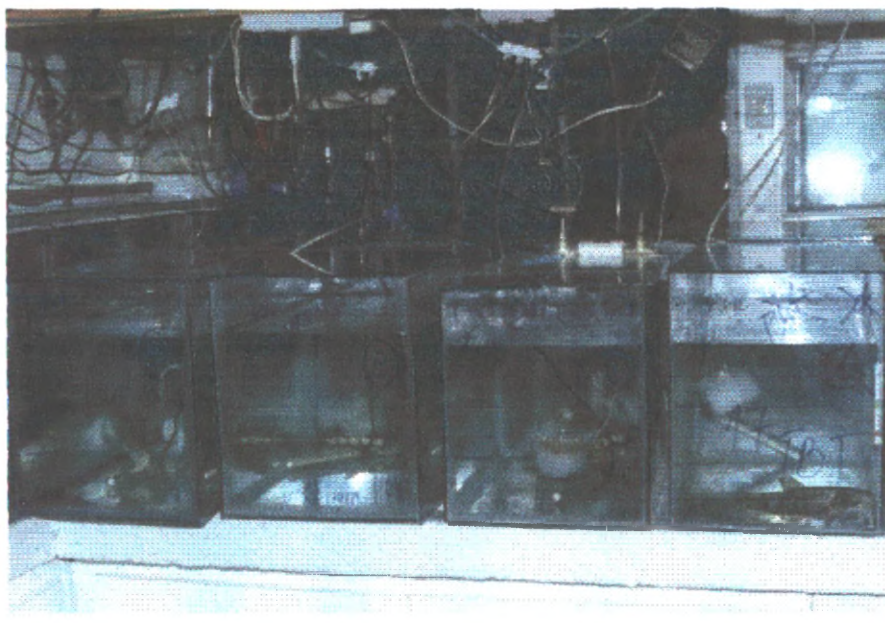
Cada traíra foi mantida em um aquário individualizado de 30 litros (Figura 02). O bioensaio foi realizado em 96 horas. As traíras foram contaminadas com injeção intra-peritoneal de diferentes doses de chumbo, a saber: os grupos foram compostos por 3 peixes sendo 7 grupos distribuídos em controle, controle positivo, controle com hormônio estradiol,  $7\mu g Pb^{++}/g$ ,  $21\mu g Pb^{++}/g$ ,  $63\mu g Pb^{++}/g$  e  $100\mu g Pb^{++}/g$ .

**FIGURA 01-** *Hoplias malabaricus* (TRAÍRA) NO AQUÁRIO DO BIOENSAIO



Fonte: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira-Ribeiro, Dpto. de Biologia Celular – UFPR.

**FIGURA 02 -** DISPOSIÇÃO DOS AQUÁRIOS INDIVIDUAIS ONDE OCORREU O PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO E EXPOSIÇÃO DAS TRAÍRAS



Fonte: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira-Ribeiro, Dpto. de Biologia Celular – UFPR.

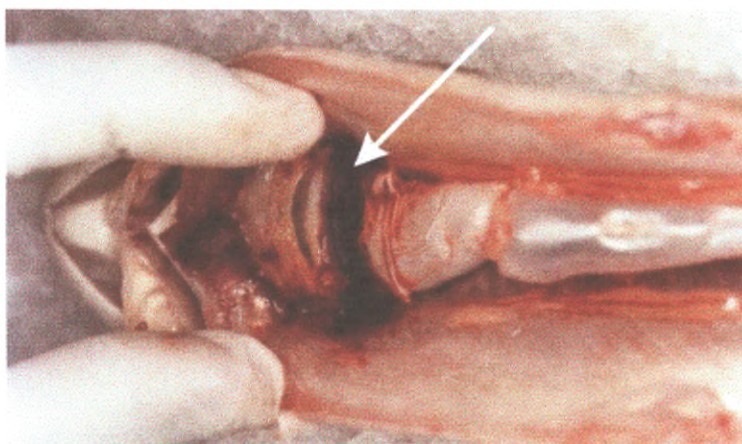
Antes do sacrifício, cada animal foi anestesiado com MS 222 (Sal metanosulfonato éster etil ácido 3-aminobenzóico) a 0,02% dissolvido em água levemente aquecida. Foram coletados sangue periférico, obtido a partir da veia dorsal por punção vertical do na base da nadadeira anal, com seringa heparinizada (FENOCCHIO et al, 1988) e o tecido renal (Figuras 03 e 04).

**FIGURA 03 - A FOTO MOSTRA O PONTO JUNTO A NADADEIRA ANAL DE ONDE FOI COLHIDO O SANGUE PARA OS ENSAIOS**



Fonte: FERRARO, 2003.

**FIGURA 04 - A SETA INDICA A LOCALIZAÇÃO DO RIM ANTERIOR DO QUAL É RETIRADA UMA PORÇÃO PARA A CULTURA DE CÉLULAS**



Fonte: FERRARO, 2003.

### 3.2.3 Teste do Micronúcleo Píscio

A fim de se verificar a freqüência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), com algumas modificações.

A técnica aplicada consistiu das etapas:

- a) Lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) Ao se coletar o sangue do animal, colocou-se uma gota na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, foi feito um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina.
- d) A lâmina secou ao ar. Após a secagem, as lâminas foram fixadas em etanol 96% por 30 minutos em cubetas.
- e) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 10 minutos e lavadas em água corrente.
- f) Foram analisadas 2000 células de cada animal em teste cego, sendo que somente foram consideradas na análise hemácias nucleadas com membrana nuclear e citoplasmática intactas. Foram consideradas como micronúcleos as partículas que em relação ao núcleo principal: não excederam 1/3 do seu tamanho, estavam nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadravam no conceito de micronúcleo mas que poderiam ser descritas como alterações morfológicas nucleares segundo CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) também foram analisadas.

### 3.2.4 Estudo da freqüência das Aberrações Cromossômicas

O método utilizado para a obtenção das metáfases mitóticas foi o indireto: cultura de tecidos sólidos de curto tempo (FENOCCHIO et al, 1991), com algumas modificações, conforme as seguintes etapas:

- a) O tecido renal foi retirado da porção anterior do rim e transferido para uma placa de petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI acrescido de 20% de soro bovino fetal.

- b) O material foi desagregado com 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.
- c) A solução de células obtida foi incubada em estufa a 27°C por 7 horas.
- d) 25 minutos antes de completado o tempo de incubação, foram pingadas 3 gotas de colchicina (0,025%) em cada recipiente para interromper a proliferação celular. A placa de petri foi então gentilmente agitada para homogeneizar o material e este foi mantido na estufa até o tempo final de incubação.
- e) Decorrido este 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 a adição de 8 ml de KCl (0,075M). A solução foi ressuspensa por cerca de 30 vezes e em seguida permaneceu por mais 30 minutos em estufa a 37°C.
- f) O fixador foi preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e mantido sob refrigeração. Dado o tempo da hipotonização, foram pingadas algumas gotas do fixador em cada tubo. O material foi ressuspensa até ficar homogêneo e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- g) O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 2 ml de fixador. O material foi ressuspensa de forma que a solução tornou-se homogênea e em seguida o tubo foi completado até o volume de 8 ml com fixador; novamente o material foi ressuspensa e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm.
- h) A etapa anterior foi repetida mais uma vez.
- i) Descartado o sobrenadante, o tubo de centrífuga foi completado até 10 ml de fixador. A solução foi ressuspensa por aproximadamente 30 vezes com uma pipeta Pasteur. Em seguida, o tubo foi tampado e colocado em freezer a -20°C por 24 horas.
- j) Decorrido este período, os tubos foram retirados do freezer e o material ressuspensa e centrifugado. O sobrenadante foi retirado e o tubo completado até o volume de 1,5 ml. O material foi então transferido para ependorfes, que foram guardados no freezer a temperatura de -20°C, até a preparação das lâminas.
- l) Para a preparação das lâminas, após o material ser retirado do freezer, ele foi ressuspensa e o material pingado (2 a 3 gotas) sobre as lâminas limpas, e após, estas secaram em temperatura ambiente.

m) A coloração utilizada seguiu a técnica convencional, com o uso de uma solução de Giemsa a 10% em tampão fosfato (pH 6,8), sendo esta colocada sobre as lâminas por um período de 10 minutos. Decorrido esse tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas ao ar. Esta coloração convencional permitiu a análise de aberrações cromossômicas como também a montagem e análise do cariótipo.

### 3.2.5 Ensaio Cometa

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

#### Preparação das lâminas com cobertura de agarose

- a) Dissolveu-se 1,5g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi então levada ao microondas até sua fervura e completa dissolução.
- b) A agarose após fervura foi deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta foi picada e levada novamente ao microondas. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Ao final desse processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.
- c) As lâminas, previamente limpas, foram mergulhadas na agarose aquecida, sendo que o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada foi limpo com um lenço de papel.
- d) As lâminas foram deixadas overnight em superfície plana e à temperatura ambiente para solidificar a cobertura de agarose.

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

- a) Dissolveu-se 100 mg de agarose normal em 20 ml de PBS e levou-se para fervura em microondas somente uma vez.
- b) Esta agarose foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando foi então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

O material coletado (sangue e tecido renal) foi armazenado em tubo de microcentrífuga do tipo ependorf e mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz até a montagem das lâminas.

### 3.2.5.1 Ensaio Cometa com Sangue

Para o ensaio cometa com sangue, o procedimento para montagem das lâminas consistiu das seguintes etapas:

- a) Foram coletados 10 $\mu$ l de sangue de cada animal e misturados com 1ml de soro bovino fetal. Desta solução, coletou-se 10 $\mu$ l e misturou-se com 120 $\mu$ l de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).
- b) Esta suspensão celular foi então depositada sob uma lâmina que já estava com a cobertura de agarose.
- c) Após a deposição da mistura agarose e suspensão celular sob a lâmina, esta foi então coberta com uma lamínula e levada a geladeira por 15 minutos.
- d) Depois de decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram retiradas gentilmente.
- e) As lâminas foram então acondicionadas em cubetas contendo a solução de lise por 24 horas.
- f) Após o tempo na solução de lise, as lâminas foram então transferidas para a cuba de eletroforese. As lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal e, quando necessário, os espaços existentes foram preenchidos com lâminas limpas.
- g) A cuba foi colocada dentro de uma caixa plástica e mantida dentro da geladeira, o que permitiu que o procedimento fosse realizado no escuro e em temperatura de aproximadamente 4°C.
- h) Na cuba de eletroforese, adicionou-se suavemente a solução de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas.
- i) Antes do início da corrida eletroforética, as lâminas ficaram na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA.
- j) Em seguida, iniciou-se a corrida de eletroforese a 25V e 300 mA por 25 minutos.
- l) Após o tempo de corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos. Esse processo foi realizado em 3 seções, com 5 minutos para cada seção. Essa neutralização é realizada aplicando

diretamente o tampão diretamente sobre as lâminas com o auxílio de uma pipeta sobre uma superfície plana.

m) As lâminas secaram em temperatura ambiente.

n) Após a secagem, as lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos.

o) As lâminas foram então guardadas para posterior coloração e visualização.

p) Para a coloração, foram adicionadas 20µl de brometo de etídeo em cada lâmina. Cada lâmina foi então coberta com lamínula e levada ao microscópio Leica de epifluorescência com aumento de 400x.

q) Foram analisados 100 núcleos em cada lâmina.

r) Os núcleos foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. A classificação dos núcleos foi realizada conforme as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo em apoptose).

s) Realizou-se a quantificação dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Os escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

### 3.2.5.2 Ensaio Cometa com Tecido Renal

Antes do sacrifício dos animais, preparou-se o tampão Tris-HCl Sacarose. O tampão de homogeneização foi preparado, no dia da coleta do material, dissolvendo-se 17,1150g de sacarose e 0,2422g de Tris em 100 ml de água destilada, sendo que o pH foi acertado em 8,6 com HCl <sub>conc.</sub> Esse tampão foi mantido sob refrigeração até o momento do uso. O procedimento para montagem das lâminas com o tecido renal consistiu das seguintes etapas:

a) Após cada animal ter sido anestesiado e ter seu sangue retirado para os testes de micronúcleo e ensaio cometa (células circulantes), fez-se uma incisão ventral longitudinal desde a abertura anal até a região da cabeça para expor a cavidade abdominal e seus órgãos internos.

b) Retirou-se o tecido renal (Figura 04), sendo que parte deste foi colocada em placa de petri contendo meio de cultura RPMI 1640 acrescido de 20% de soro bovino fetal para o teste de alterações cromossômicas e outra parte foi colocada no tampão de homogeneização, sendo que o volume de tampão adicionado era equivalente a 4

vezes o volume de tecido renal coletado. O tampão contendo o tecido renal foi então armazenado em frascos escuros e sob refrigeração.

c) O tampão contendo o tecido renal foi levado para desagregação do tecido em homogeneizador Potter a 1500 rpm por cerca de 30 segundos.

d) Do homogeneizado obtido, coletou-se em ependorfe 10 $\mu$ l.

e) Para a realização do ensaio, os 10 $\mu$ l coletados de homogeneizado foram então misturados com 120 $\mu$ l de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).

f) A suspensão celular assim obtida foi utilizada para a montagem das lâminas, conforme os mesmos procedimentos utilizados para montagem das lâminas com o sangue.

#### 4. RESULTADOS

Foram analisados vinte animais distribuídos em sete grupos, sendo seis grupos compostos por três animais e um grupo com dois animais.

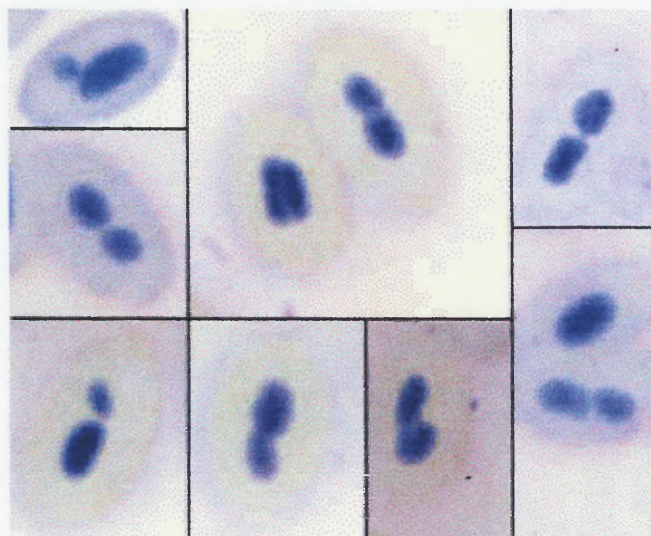
No ensaio de Micronúcleo Písceo, foram analisadas 2000 células por indivíduo. Nesse teste, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratados. A metodologia estatística utilizada foi o teste de Kruskal-Wallis, porém esse resultado não recebeu muita confiabilidade, pois é sabido que o reduzido número de peixes pode levar a erro de freqüência de alterações nucleares.

Nas lâminas onde foram realizados os esfregaços de sangue periférico analisou-se a presença ou ausência das estruturas classicamente descritas como micronúcleos. Além destas estruturas foram computadas as alterações morfológicas nucleares encontradas (Tabela 01; Figura 05).

TABELA 01- MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

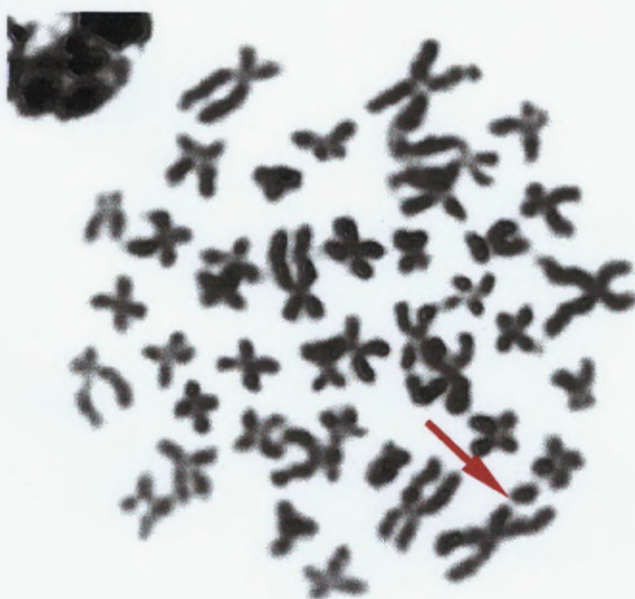
Tratamento	Animal	Número de células analisadas	Células Normais	Células com Micronúcleos	Alterações Morfológicas
Controle	1	2000	1986	0	14
	2	2000	1977	0	23
	3	2000	1982	0	18
Controle Estradiol	4	2000	1961	0	39
	5	2000	1971	0	29
	6	2000	1985	0	15
Controle Positivo	7	2000	1959	0	41
	8	2000	1939	0	61
	9	2000	1993	0	7
7 µg Pb <sup>++</sup> /g	10	2000	1985	0	15
	11	2000	1966	0	34
	12	2000	1976	0	24
21 µg Pb <sup>++</sup> /g	13	2000	1966	0	34
	14	2000	1954	0	46
	15	2000	1978	0	22
63 µg Pb <sup>++</sup> /g	16	2000	1948	0	52
	17	2000	1925	0	75
	18	2000	1987	0	13
100 µg Pb <sup>++</sup> /g	19	2000	1951	0	49
	20	2000	1923	0	77

**FIGURA 05-** EXEMPLOS DE ALGUMAS ANOMALIAS MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS NOS EXEMPLARES COLETADOS



No ensaio das Aberrações Cromossômicas, foram analisadas cerca de 40 metáfases de cada exemplar de *H. malabaricus*. O número diplóide determinado nos exemplares analisados foi de  $2n=42$ . Foram encontradas algumas alterações estruturais (Figura 06), porém, os resultados obtidos, após análise estatística, não foram significantes.

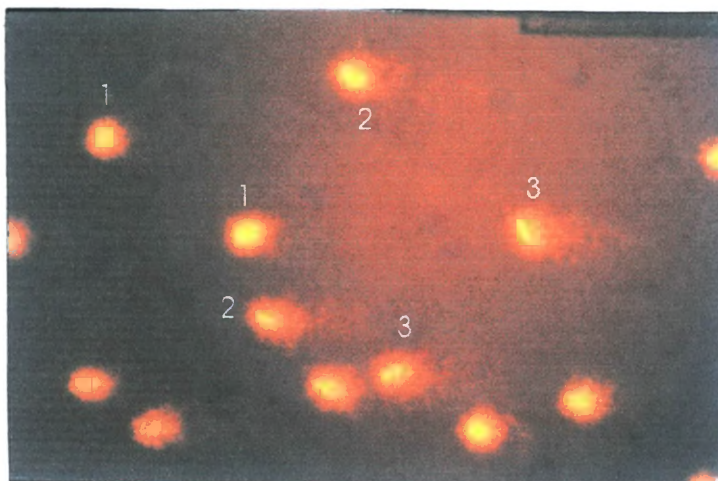
**FIGURA 06-** METÁFASE DE *Hoplias malabaricus* ( $2N=42$ ) APRESENTANDO QUEBRA CROMATÍDICA



No ensaio cometa foram observadas 100 células por indivíduo, sendo que dentre estas foram observadas todos os tipos de danos (Figuras 07 e 08). Ao multiplicar os danos pelo número de núcleos analisados, obteve-se os escores das células sanguíneas e das células renais. A média destes mostraram-se maiores para o sangue do que para o tecido renal (Tabelas 02 e 03; Figura 09).

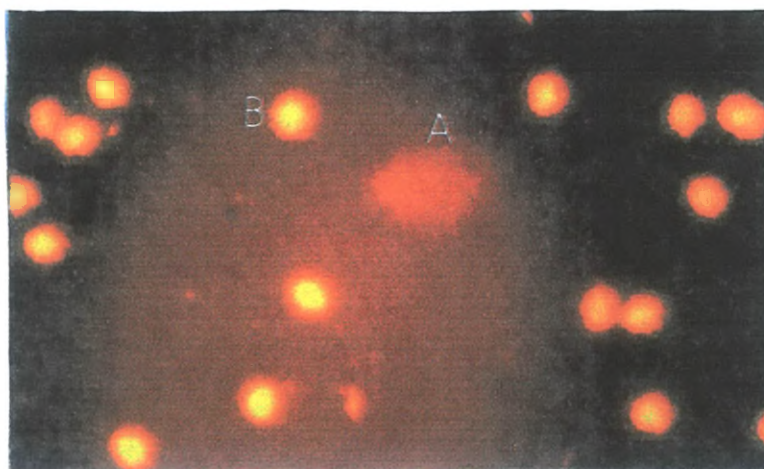
Os escores obtidos foram submetidos às análises estatísticas através dos testes de Kruskal-Wallis para o tecido renal e para o sangue separadamente e o teste de Wilcoxon para a comparação entre os resultados observados nos cometas de ambos.

**FIGURA 07 - DIFERENTES CLASSES DE COMETA**



Fonte: FERRARO, 2003.

**FIGURA 08- COMPARAÇÃO ENTRE NÚCLEO EM APOPTOSE (A) E NÚCLEO ÍNTEGRO (B)**



Fonte: FERRARO, 2003.

TABELA 02 - TOTAIS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS ANALISADAS NO ENSAIO COMETA POR INDIVÍDUO COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS, ESCORES E MÉDIAS.

Tratam.	Células analisadas	Classes					Escore	Média $\pm$ s
		0	1	2	3	4		
Controle	100	68	20	10	1	1	47	43 $\pm$ 18,33
	100	67	17	8	6	2	59	
	100	84	10	5	1	0	23	
Controle com Estradiol	100	72	12	10	5	1	51	52,33 $\pm$ 6,11
	100	72	17	5	4	2	47	
	100	71	11	9	6	3	59	
Controle Positivo	100	49	18	13	8	12	116	164,67 $\pm$ 33,41
	100	12	42	19	21	6	167	
	100	8	30	28	19	17	211	
7 $\mu$ gPb/g	100	7	21	18	38	16	235	205 $\pm$ 33,41
	100	3	38	49	7	3	169	
	100	5	22	41	21	11	211	
21 $\mu$ gPb/g	100	0	3	29	43	25	290	267,67 $\pm$ 29,67
	100	0	10	25	41	24	279	
	100	0	12	49	32	7	234	
63 $\mu$ gPb/g	100	3	32	24	33	8	211	227,67 $\pm$ 28,0
	100	4	14	20	42	20	260	
	100	4	31	22	35	8	212	
100 $\mu$ gPb/g	100	8	28	29	31	4	195	229,5 $\pm$ 48,79
	100	0	10	29	48	13	264	
<b>Total</b>	<b>2000</b>	<b>537</b>	<b>398</b>	<b>442</b>	<b>442</b>	<b>183</b>	<b>3340</b>	

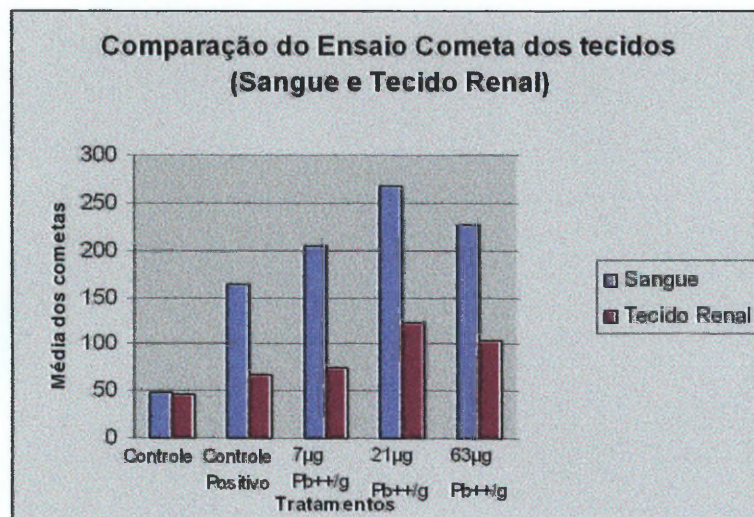
TABELA 03 - TOTAIS DE CÉLULAS DO TECIDO RENAL ANALISADAS NO ENSAIO COMETA POR INDIVÍDUO COM OS RESPECTIVOS TIPOS DE DANO ENCONTRADOS, ESCORES E MÉDIAS.

Tratam.	Células analisadas	Classes					Escore	Média $\pm$ s
		0	1	2	3	4		
Controle	100	76	6	8	7	3	55	39,67 $\pm$ 13,32
	100	82	8	7	3	0	31	
	100	80	10	7	3	0	33	
Controle com Estradiol	100	78	6	6	6	4	52	53,33 $\pm$ 22,03
	100	48	40	11	2	2	76	
	100	74	21	4	1	0	32	
Controle Positivo	100	55	33	12	0	0	57	67,33 $\pm$ 18,77
	100	33	48	16	3	0	89	
	100	55	35	9	1	0	56	
7 $\mu$ gPb/g	100	40	49	9	2	0	73	74,33 $\pm$ 3,21
	100	43	45	10	1	1	72	
	100	40	45	12	3	0	78	
21 $\mu$ gPb/g	100	12	54	26	8	0	130	123,67 $\pm$ 10,12
	100	16	48	27	9	0	129	
	100	19	54	23	4	0	112	
63 $\mu$ gPb/g	100	24	48	17	10	1	116	103,67 $\pm$ 10,69
	100	25	56	16	3	0	97	
	100	25	57	13	5	0	98	
100 $\mu$ gPb/g	100	18	48	23	11	0	127	121,0 $\pm$ 8,48
	100	21	54	14	11	0	115	
<b>Total</b>	2000	864	765	270	93	11	1628	

Através dos ensaios cometa de eritrócitos e células do tecido renal, verificou-se que o chumbo inorgânico (Pb<sup>++</sup>) atinge ambos os tipos de células. Esta verificação foi comprovada com o teste estatístico de Kruskal-Wallis que mostrou que os resultados obtidos com os animais controles foram estatisticamente diferentes dos obtidos com os tratados com  $p < 0,05$  nos tecidos testados ( $p=0,0139$  para o tecido renal e  $p=0,0115$  para o sangue).

Esse teste também mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as diferentes doses de chumbo utilizadas no bioensaio, sendo que os valores de  $p$  obtidos para o sangue foram maiores que 0,05 (0,2843 entre as doses 7 e 21 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g; 0,7022 entre as doses 7 e 63 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g e 0,4919 entre as doses 21 e 63 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g) do mesmo modo que os valores de  $p$  para o tecido renal também foram maiores que 0,05 (0,0925 entre as doses 7 e 21 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g; 0,2513 entre as doses 7 e 63 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g e 0,5924 entre as doses 21 e 63 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g).

**FIGURA 09** – GRÁFICO COMPARANDO OS ESCORES OBTIDOS COM SANGUE E TECIDO RENAL



## 5. DISCUSSÃO

Para avaliação dos efeitos de substâncias genotóxicas nos ecossistemas aquáticos, os peixes têm se mostrado bastante úteis. Estes animais podem entrar em contato com o xenobionte disperso na água ou através de sua alimentação, sendo capazes de sofrer efeitos de bioacumulação. Esses animais também respondem bem a agentes mutagênicos em baixas concentrações e apresentam vantagens como a facilidade de manutenção em laboratórios.

No ensaio do Micronúcleo Písceo não se verificou diferença significativa entre os grupos controle e tratados. Esse ensaio, apesar de recomendado para análises ambientais e de fácil realização, depende da cinética da proliferação celular. Desse modo, é possível que o resultado obtido tenha sido errôneo em função do tempo de exposição não ter sido adequado para a espécie nem para o agente mutagênico em estudo. No trabalho de FERRARO et al (2004) este teste mostrou-se eficaz para contaminação sub-crônica por via trófica em *Hoplias malabaricus*.

Destaca-se também que o ensaio pode apresentar uma certa falta de sensibilidade, já que não detecta as não disjunções mitóticas se estas não levarem à perda de cromossomos na anáfase nem aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não originarem fragmentos acêntricos, segundo METCALFE, 1989.

Além desses aspectos, a análise dos resultados observados nesse teste pode também ter sido comprometida em função do pequeno número de animais analisados (3 para cada grupo), pois sabe-se que quanto menor o grupo testado, maior a possibilidade de ocorrerem erros na análise.

No ensaio das Aberrações Cromossômicas, foram analisadas 30 metáfases por indivíduo. Este ensaio não indicou diferença significativa entre os grupos controle e tratados, apesar da literatura apontar este metal como capaz de provocar danos nas proteínas de manutenção estrutural do DNA ou naquelas envolvidas com os mecanismos de reparo (MERIAN, 1991; PAIN, 1995 e HARTIWIG et al, 2002).

Este ensaio, apesar de comumente utilizado em avaliações de genotoxicidade, requer experiência e perícia na preparação do material para se obter metáfases com qualidade, que possibilitem uma boa análise (KESHAVA et al, 1995). Nossos resultados mostraram metáfases com boa qualidade (Figura 06),

passíveis de análise, porém não foram verificadas alterações cromossômicas estatisticamente significativas.

A ocorrência das aberrações cromossômicas é dependente da intensidade ou concentração dos agentes mutagênicos, bem como do tipo celular em estudo e do momento do seu ciclo celular onde ocorreu a exposição (OBE et al., 2002). Sendo assim, a ausência de aberrações cromossômicas pode ter sido resultado da baixa concentração do chumbo ou da curta duração da exposição (96 horas), não suficientes para provocar danos cromossômicos. Trabalhos recentes nos mostram que a concentração de 21  $\mu\text{g Pb}^{++}/\text{g}$  (CESTARI et al, 2004 e FERRARO et al, 2004) em contaminação sub-crônica (13 doses tróficas – 60 dias) apresenta danos no DNA tanto no teste de aberrações cromossômicas como nos teste de micronúcleo e ensaio cometa.

Os danos que o DNA podem sofrer em função de agentes mutagênicos são muitos, sendo que as aberrações cromossômicas são uma pequena fração de uma grande quantidade de mudanças no DNA cromossômico e refletem a enorme plasticidade do genoma (OBE et al, 2002). A não ocorrência de aberração não deve significar que não houve dano no DNA após a exposição mas sim que a exposição não ocasionou alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais.

O ensaio cometa mostrou diferença significativa entre os grupos tanto na análise de cometas em sangue como em tecido renal, mostrando a alta sensibilidade desse ensaio, também apresentada e discutida por CESTARI et al (2004) e FERRARO et al (2004).

Além das vantagens já citadas para a realização do ensaio cometa com o sangue, como o fato deste ser facilmente obtido e não necessitar de dissociação das células, verificou-se que o sangue apresenta maior sensibilidade ao chumbo inorgânico em comparação ao tecido renal. Isto foi verificado através de um maior número de células com dano (maiores escores) no sangue do que no tecido renal e ainda que a menor dose de chumbo ( $7\mu\text{g Pb}^{++}/\text{g}$ ) ocasionou dano somente no sangue (Tabela 2 e Figura 09). Este fato nos que mesmo em dosagens baixas em testes agudos, o sangue um tecido indicado para detecção de dano no DNA.

Pela primeira vez foi realizado um bioensaio com *Hoplias malabaricus* o ensaio cometa em células do tecido renal desagregado com o tampão Tris-HCl-Sacarose. Esta metodologia se mostrou adequada pois possibilitou a análise das

células após eletroforese e resultados estatisticamente semelhantes aos realizados com o sangue.

Os resultados obtidos entre o controle e as demais doses (21 e 63 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g) mostram que houve diferença significativa em relação aos controles, com p menor que 0,05 tanto nas células sanguíneas quanto nas renais (para o sangue os valores de p observados foram 0,0022 entre o controle e a dose 21 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g e 0,0178 entre o controle e a dose 63 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g e para o tecido renal, os valores de p foram 0,0017 entre o controle e a dose 21 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g e 0,0093 entre o controle e a dose 63 $\mu$ g Pb<sup>++</sup>/g).

O teste de Wilcoxon para amostras pareadas mostrou que houve maior dano nas células sanguíneas que nas células do tecido renal, sendo que a diferença observada entre os tecidos foi estatisticamente significativa com  $p < 0,05$  ( $p = 0,0005$ ).

A diferença entre os resultados obtidos no cometa dos tecidos pesquisados pode ser explicada pelo método de aplicação do agente genotóxico bem como pelo tempo de contaminação. A injeção intra-peritoneal atinge mais rapidamente o sangue que os demais tecidos, somada com o curto período de tempo decorrido entre a injeção e a coleta dos tecidos, (96 horas) evidencia-se contaminação de forma aguda. Já nas células de tecido renal, o chumbo injetado intraperitonealmente leva mais tempo para atingir e provocar danos no DNA.

Embora nos ensaios Cometa e de Micronúcleos Píscios estejam sendo analisados eritrócitos circulantes, a natureza do dano detectado é diferente. No ensaio Cometa, analisa-se danos que envolvem segmentos muito curtos na fita de DNA, enquanto que no Micronúcleo Píscio os danos detectáveis são de natureza muito maior, o que também ocorre com as Aberrações Cromossômicas, onde são analisadas alterações numéricas (euploidias e aneuploidias) e/ou estruturais (quebras, gaps, descondensações, inversões e fragmentos).

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho realizado em *Hoplias malabaricus* submetida à contaminação aguda com diferentes concentrações de  $Pb^{++}$ , mostrou que:

- O teste do Micronúcleo Písceo e alterações morfológicas nucleares não foi conclusivo, provavelmente devido ao tempo de exposição ao chumbo inorgânico;
- O teste das Aberrações Cromossômicas não se mostrou estatisticamente significativo ao se comparar os animais controle com os tratados, provavelmente devido ao tipo de aplicação do xenobionte e ao tempo de exposição a ele;
- O ensaio cometa, tanto em tecido como em células circulantes mostra a atividade mutagênica do  $Pb^{++}$ , mesmo em doses baixas e por curto período e que o ensaio cometa do sangue periférico é o mais indicado para se analisar a contaminação aguda por  $Pb^{++}$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85C, p.5-9, 1986.

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

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

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Sci.**, Ottawa, vol. 47, p. 2123 – 2136, 1990.

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. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, 27(2), 270-274, 2004.

CIPRIANO, R.R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; CESTARI, M.M.; FENOCCHIO, A.S.; Evaluation of the effects of tributyltin (TBT) on chromosomes of the neotropical fish *Astyanax sp.* (Pisces, Tetragonopterinae). **Cytologia**, nº 69, v.2, p.187-190, 2004.

DE LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. Poluição: Causas, efeitos e controle. **Genética Toxicológica** p.119-137. 2003.

ESPINA, N. G.; WEISS, P. DNA repair in fish from polluted estuaries. **Marine Environmental Research**, Kidlington, v. 39 p. 309 – 312, 1995.

FENOCCHIO, A.S.; VENERE, P.C.; CESAR, A.C.G.; DIAS, A.L.; BERTOLLO, L.A.C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v. 44, p.161-166, 1991.

FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. **Revista Brasileira de Genética**, v.11(4), p. 847-852, 1988.

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

FERRARO, M. V.; FENOCCHIO, A. S. ; MANTOVANI, M. S. ; CESTARI, M. M. ; RIBEIRO, C. A. O. . Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleous and Chromosome Aberrations tests. **Genetics and Molecular Biology**, Brasil, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; FORLIN, L. Immunochemical cross-reactivity of  $\beta$ -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology**, v.9, p. 1-13, 1991.

HARTWIG, A.; ASMUSS, M.; BLESSING, H.; HOFFMANN, S.; JAHNKE, G.; KHANDELWAL, S.; PELZER, A.; BÜRKLE, A. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 40, p. 1179 – 1184, 2002.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-192, 1973.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of Cytogenetic

Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v. 18, p. 277 – 291, 1991

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

JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 410, p. 123 – 140, 1998.

KESHAHA, C; ONG, T.; NATH, J. Comparative studies on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberrations in V79 cell. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 328, p. 63 – 71, 1995.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖN, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research – DNA Repair**, Amsterdam, v. 363, p. 89 – 96, 1996.

LACADENA, J. R. **Citogenética**. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense, 1996.

McCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. **Biomarkers of environmental contamination**. Lewis, Boca Raton, USA, 1990.

MERIAN, E. (Ed.). **Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance**. New York: VCH, Cap. II, 1991.

METCALFE, C. D. Testes for Predicting Carcinogenicity in Fish. **CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences**. v. 1, p. 111 – 129, 1989.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. 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**, v.367, p.245-251, 1996.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K.; DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 399, p. 135 – 147, 1998.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ – LÓPEZ, W.; FOLLE, G. A.; DRETS, M. E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 504, p. 17 – 36, 2002.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86 – 94, 1990.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 198, p. 259 – 267, 1992.

PADRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p.345-356, 1995.

PERRY, P. E. & EVANS, H. J. **Cytological deletion of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange**. *Nature*, 258, p. 121-125, 1975.

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

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 722, p. 225 – 254, 1999.

SANCHEZ-GALAN, S. LINDE, A.R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: Differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 43, p.301-304, 1999.

SASAKI, Y.F.; TSUDA, S.; IZUMIYAMA, F.; NISHDATE, E. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. **Mutation Research**, v.388, p.33-44, 1997.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.31, p.9-15, 1975.

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

SKERFVING, S.; HANSSON, K.; MANGS, C.; LINDSTEN, J.; RYMAN, N. Methylmercury-induced chromosomal damage in man. **Environmental Research**, v. 7, p.83-89, 1974.

TAO, S.; LIU, C.; DAWSON, R.; CAO, J.; LI, B. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*). **Arch. Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 37, p. 352 – 357, 1999.

VARELLA-GARCIA, M. Teste de Troca entre Cromátides Irmãs (TCI). In **Mutagenese, Teratogenese e Carcinogenese: métodos e critérios de avaliação**. Sociedade Brasileira de Genética, 123-140. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). **Mutagenese Teratogenese e Carcinogenese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1991.

WHO, Environmental health criteria for methylmercury, **Environmental Health Criteria** 101, p.144, Geneva, 1990.

YENDLE, J. E.; TINWELL, H.; ELLIOT, B. M.; ASHBY, J. The genetic toxicity of time: Importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 375, p. 125 – 136, 1997.