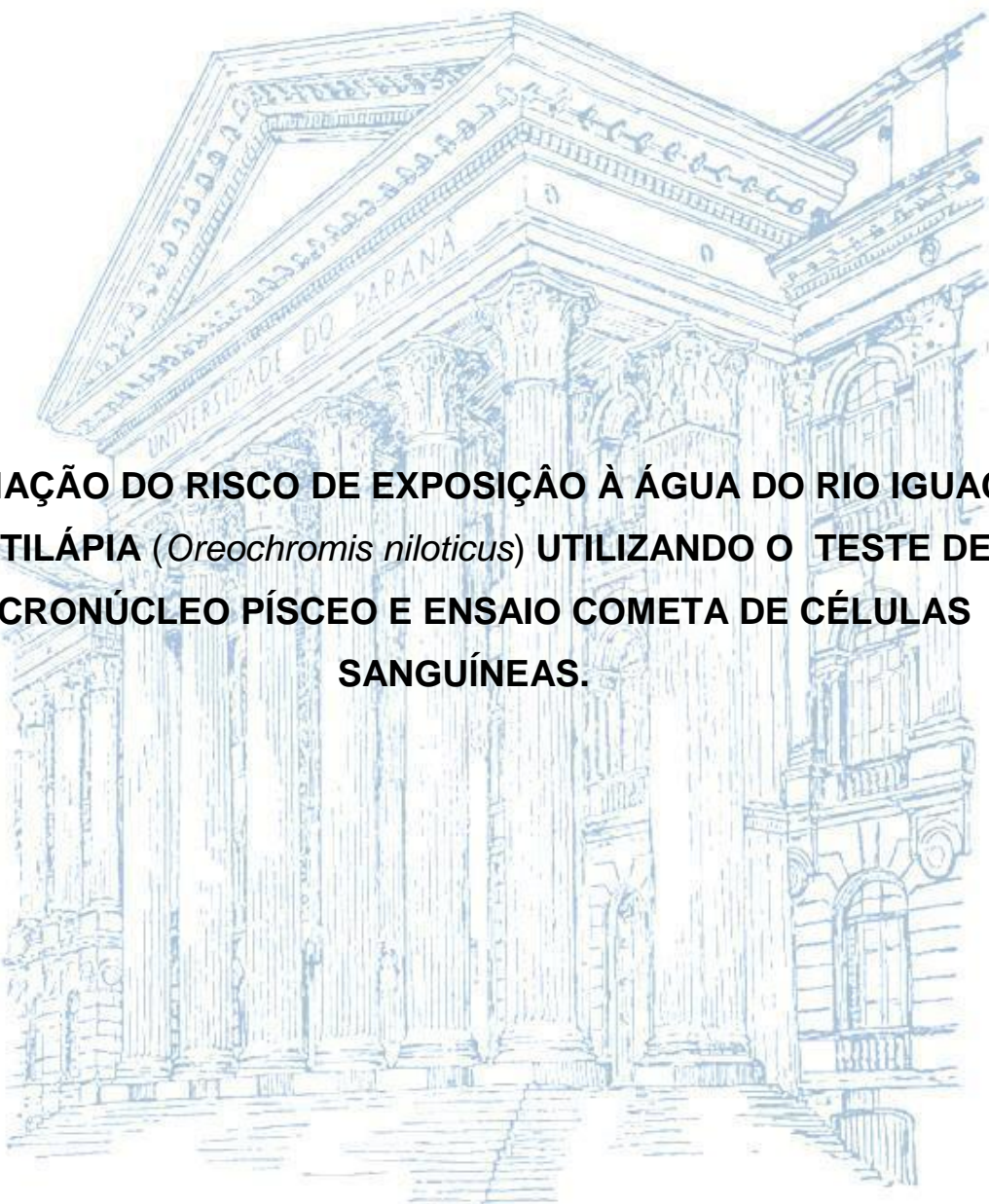


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALESSANDRO LICK CORDEIRO



**AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO À ÁGUA DO RIO IGUAÇU
EM TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO O TESTE DE
MICRONÚCLEO PÍSCEO E ENSAIO COMETA DE CÉLULAS
SANGUÍNEAS.**

CURITIBA

2016

ALESSANDRO LICK CORDEIRO

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO À ÁGUA DO RIO IGUAÇU
EM TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO O TESTE DE
MICRONÚCLEO PÍSCEO E ENSAIO COMETA DE CÉLULAS
SANGUÍNEAS.**

Monografia apresentada à disciplina
BIO027 Estágio Supervisionado em
Biologia II como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Departamento de Genética,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Margarete Cestari
Co-orientadora: Ms. Laís Fernanda Oya Silva

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Denilde e Ari, por todo o apoio, incentivo e por acreditarem em mim e no meu sonho de cursar biologia, amo vocês, também a toda minha família em especial minha irmã Mayara.

À Prof^ª. Dr^ª. Marta Margarete Cestari, pela chance de realização deste trabalho, e por me ajudar em momentos de difícil decisão e da orientação e confiança investida em mim.

Não poderia deixar de agradecer também ao Prof^º. Dr. Danon Cledes Cardoso, por todo o incentivo, pelo conhecimento compartilhado comigo durante a graduação, e por me mostrar a paixão pela pesquisa.

Aos colaboradores do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental estagiários, mestrandos e doutorandos, em especial a minha co-orientadora Ms. Laís Fernanda Oya Silva, que me ensinou tudo para realizar o trabalho e teve a maior paciência comigo, além de ser uma grande amiga na vida, não poderia deixar de agradecer outros nomes como Taynah, Rodrigo, Antônio, Cintya que também foram de grande ajuda, que além da paciência compartilharam seus conhecimentos comigo.

Agradeço aos meus colegas de curso, principalmente aos mais próximos que me acompanharam nessa reta final; Bruna Zorek, Bruno Gomes, Lillian de Oliveira, Mari Kowalschuk, Stephanie Bianco, Anankha Salvalaggio, Fabi Pereira que me ajudaram a superar o dia a dia rotineiro da Universidade, demonstrando que juntos sempre podemos ir além.

Também aos outros vários amigos que conquistei durante a vida, e que a biologia me proporcionou; Patrícia Siqueira, Stephanni Ferrarezi, Tamy Ribeiro, Katherine Lezama entre outros e que apesar da distância sempre acreditaram em mim.

RESUMO

A água doce presente na superfície terrestre é destinada a múltiplos usos (domiciliares, comerciais, lazer e etc.) e com a falta de um adequado sistema de esgoto sanitário junto aos constantes efluentes jogados nos rios resultam na diminuição da qualidade da água e na perda da biodiversidade regional. Com o rio Iguaçu não seria diferente, pois este vem sofrendo alterações antropogênicas que ultrapassam a capacidade de autodepuração do rio, sendo então considerado o segundo rio mais poluído do Brasil. Portanto o trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos genotóxicos da água do rio Iguaçu na saúde de exemplares adultos de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Esta espécie é oriunda do Delta do rio Nilo e introduzida no Brasil há pelo menos 40 anos, onívora, reproduzida em pisciculturas e de fácil manutenção em laboratório. A coleta da água para a fase experimental foi realizada perto da confluência com o rio verde, no município de Araucária-PR. Foram realizados bioensaios com um total de 120 adultos expostos à água poluída em condições laboratoriais por 72 dias, sendo 12 tanques divididos em triplicatas para cada tratamento com 10 peixes (machos e fêmeas na proporção 1:1). A água foi testada na forma original sem diluição (100%), e sob duas diferentes diluições (25 e 50%) do rio, além do grupo controle (CN) que recebeu água purificada através de filtros de resina e carvão ativado de outra fonte. O sangue foi coletado para a realização do teste do micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares e do ensaio cometa. O teste do micronúcleo pisco apresentou diferenças significativas, quando comparados os tratamentos e o controle negativo com relação às alterações morfológicas do tipo “Blebbbed” e “Notched” que também existe uma diferença gradual do controle negativo para a maior concentração de água do rio (100%) com relação à frequência de AMNTs (alterações morfológicas nucleares totais). O ensaio cometa também apresentou resultados significativos entre os grupos controle e o aumento gradual de concentração da água do rio Iguaçu nos tratamentos, o que indica que esta água é mutagênica e genotóxica.

Palavras-chave: alterações morfológicas nucleares, genotoxicidade, peixe, mutagenicidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplar de <i>Oreochromis niloticus</i>	12
Figura 2- Modelo de Nucleóides com danos de 0 a 4, utilizado na classificação para análise do ensaio cometa.....	18
Figura 3- Eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> (Aumento de 1000x). Alguns exemplos de alterações morfológicas nucleares, as letras indicam: (A) célula com núcleo normal, (B) célula com micronúcleo, (C) “Lobed”, (D) “Notched”.	20
Figura 4- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológica nuclear em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> , sendo este do tipo “Lobed”.	21
Figura 5- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológica nuclear em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> , sendo este do tipo “Binúcleo”.	22
Figura 6- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológica nuclear em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> , sendo este do tipo “Blebbled”.	23
Figura 7- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológica nuclear em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> , sendo este do tipo “Notched”.	24
Figura 8- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológicas nucleares totais (AMNT) em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> , sendo elas micronúcleo, “Lobed”, “Notched”, “Blebbled” e “Binúcleo”.	25
Figura 9- Danos ao DNA em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> , detectados por ensaio cometa a partir do score das classes de 0 a 4. Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%).	26

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 BIOMARCADORES GENÉTICOS	8
1.1.1 Teste do micronúcleo Písceo.....	8
1.1.2 Ensaio Cometa	10
1.1.3 <i>Oreochromis niloticus</i>	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 ORGANISMO UTILIZADO	14
3.2 COLETA DE ÁGUA	14
3.3 ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS	14
3.4 BIOENSAIO	14
3.5 SACRÍFICIO E COLETA DE AMOSTRAS	15
3.6 BIOMARCADORES GENÉTICOS	15
3.6.1 Teste do Micronúcleo Písceo (MNP).....	15
3.6.2 Ensaio Cometa	16
3.6.3 Ensaio cometa com eritrócitos	17
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1 TESTES DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE <i>Oreochromis niloticus</i>	20
4.2 ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>Oreochromis niloticus</i>	26
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

A comunidade científica e as agências regulatórias, nos últimos anos têm se conscientizado dos impactos ambientais sobre a saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (BICKHAM et al., 2000). A partir da necessidade da verificação desta problemática, estudos de toxicidade com organismos aquáticos constituem-se como uma ferramenta efetiva para avaliação de efeitos de poluentes sobre os organismos vivos. Além disso, outros fatores importantes para o estabelecimento de limites permissíveis de lançamento de efluentes líquidos nos corpos hídricos são a avaliação de risco/periculosidade de agentes químicos e o monitoramento da qualidade da água. (ZAGATTO, 1998).

No estado do Paraná, encontram-se duas bacias hidrográficas fundamentais: a bacia do Rio Paraná, e a bacia hidrográfica do Rio Iguaçu. (GALLOTTA & CHRISTENSEN, 2012). Ao atravessar a Região Metropolitana de Curitiba, o rio Iguaçu recebe o lixo industrial e também esgoto doméstico. Ao deixar Curitiba, o rio não apresenta sinais de peixes, sua cor é cinza-escuro, as águas emitem cheiro de gás sulfídrico e manchas vermelhas se acumulam nas margens (dejetos de ferro, mercúrio e manganês). Esta situação faz do Rio Iguaçu o segundo rio urbano mais poluído do país, atrás apenas do Rio Tietê (IBGE, 2010).

Por serem considerados bons bioindicadores, os peixes são utilizados como organismos de testes laboratoriais (organismos teste) e biomonitoramentos (biomonitoradores). Os principais motivos são-a sua atuação em diversos níveis da cadeia trófica, capacidade de bioacumulação e respostas à presença de xenobióticos em baixas concentrações (GOKSOYR et al., 1991; MINISSI et al., 1996).

Neste sentido, o biomonitoramento e o uso de biomarcadores precoces de contaminação ambiental, acenam como ferramentas consolidadas e viáveis no estudo da ecotoxicologia, ajudando a compreender os efeitos nocivos de alguns poluentes para a saúde dos rios, da biodiversidade e do homem (SOUZA et al. 2013). Desta maneira, este trabalho pretende analisar o risco constante da biota (peixes) e em um segundo plano, o possível risco de populações humanas que dependem do rio para o consumo da água.

1.1 BIOMARCADORES GENÉTICOS

Biomarcadores podem ser definidos como: “qualquer resposta biológica, a um ambiente químico”. (W.H.O., 1993). Estes São considerados ferramentas indispensáveis em programas de biomonitoramento, pois apresentam grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e relativo baixo custo de análise (McCARTHY & SHUGART, 1990; STEGEMAN et al., 1992; BAINY, 1993).

-

Análises de genotoxicidade são executadas como biomarcadores de toxicidade, ou de efeitos adversos. O impacto de substâncias e elementos tóxicos sobre a integridade e funcionamento do DNA dos organismos bioindicadores, tem sido investigado em diversas situações utilizando diversos biomarcadores. Biomarcadores genéticos têm sido utilizados com frequência como ferramentas para detecção de exposição e avaliação dos efeitos de poluição utilizando análises de aberrações cromossômicas, adutos de DNA, quebras no DNA, frequência de formação de micronúcleo e de alterações morfológicas nucleares (BOMBAIL et al., 2001).

1.1.1 Teste do micronúcleo Písceo

Originalmente desenvolvido por SCHMID (1975), o teste do micronúcleo foi criado para células da medula óssea de camundongos e então adaptado por HOOFTMAN e de RAAT (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixe mantidas em laboratório. Originou-se então o que hoje é conhecido por Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO, TILBURY & MYERS, 1990).

Este teste tem sido usado para estimar o nível de exposição a contaminantes, medindo assim o dano cromossômico estrutural ou numérico e tem sido usado para avaliar mutagenicidade, recomendado para estudos ambientais tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME et al, 1998).

Micronúcleos são respostas a curto prazo a uma substância genotóxica (HEDDLE et al, 1991). A avaliação das anomalias nucleares e os micronúcleos são ensaios muito utilizados para investigação de efeitos mutagênicos de poluentes ambientais em peixes (AL-SABTI, 1986).

Os micronúcleos são cromossomos, ou parte deles, que não foram incorporados dentro do núcleo principal da célula filha durante a divisão celular, e apresentam-se como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntica em aparência ao núcleo celular com a mesma refringência e bordas distinguíveis. Podem, também, ocorrer anomalias celulares, quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose, fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, e apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL et al., 2001).

São considerados micronúcleos aqueles que são formados e visivelmente separados do núcleo principal da célula, e possuem um tamanho correspondente a 1/5 a 1/20 do tamanho deste núcleo, não ultrapassando 1/3 do tamanho do núcleo principal. Em peixes, devido ao tamanho reduzido dos cromossomos, esta proporção de tamanho fica, aproximadamente, entre 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo original (AL SABTI e METCALFE, 1995; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO et al., 2001). Durante o processo de contagem dos micronúcleos, são analisadas entre 1 mil e 2 mil células, com membranas citoplasmáticas e nucleares intactas, não sendo analisadas aquelas que estejam sobrepostas ou danificadas (AL SABTI; e METCALFE, 1995).

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 como:

- ❖ *“Blebbbed”*: 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.
- ❖ *“Lobed”*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *“Blebbbed”*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- ❖ *“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.

❖ “*Notched*”: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo (invaginações). Essas invaginações parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

1.1.2 Ensaio Cometa

O Ensaio cometa, também conhecido como SCGE (Single-Cell Gel Electrophoresis), detecta quebras na fita do DNA e sítio álcali-lábeis através da medição da migração do DNA a partir de DNA nuclear imobilizado (SINGH et al. 1988). O nome refere-se à formação de uma longa cauda (como a de um cometa), de fragmentos de DNA (BOMBAIL, GORDON, BATTY, 2001). Originalmente, a técnica do ensaio cometa foi desenvolvida para detectar defeitos genotóxicos, e hoje é muito empregada na área clínica em estudos de reparo do DNA no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano (COLLINS, 1997).

A técnica foi desenvolvida por OSTLING e JOHANSON (1984), utilizando células misturadas em agarose de baixo ponto de fusão, depositadas sobre uma lâmina com agarose normal. Posteriormente, as células presentes na lâmina passam por um processo de lise celular, por detergentes e soluções salinas concentradas. A lise permite a liberação do DNA. As lâminas eram submetidas à eletroforese em tampão neutro. Porém, haviam algumas limitações, pois só era capaz de detectar quebras de fita duplas de DNA, e que poderia ser confundido com o RNA ainda presente no núcleo (ROJAS; LOPES; VALVERDE, 1999). Então, SINGH et al. (1988) fez uma variação da técnica descrita anteriormente, substituindo o tampão neutro utilizado na corrida eletroforética por um tampão alcalino, com pH superior a 13. Com esta modificação, foi possível detectar no DNA quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis e sítios de reparo tardio.

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 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 sequência do teste (YENDLE et al, 1997).

Portanto a técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não possuir dano migrará em conjunto, caracterizando-se como um círculo. As células que possuírem danos em seu DNA, durante a corrida eletroforética, formarão fragmentos diversos. Fragmentos menores tendem a migrar com mais velocidade que fragmentos maiores. Ocorrendo danos intensos, muitos fragmentos de tamanhos variados serão formados, e migrarão em velocidades diferentes, formando então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990).

Uma das metodologias para quantificar o dano é realizada através de uma classificação dos nucleóides baseada na relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelos fragmentos de DNA. Esta classificação varia entre Classe 0, onde não ocorreu dano, até a Classe 4, indicando a ocorrência de muitos danos ao DNA (COLLINS et al., 1997).

Diversas publicações demonstram que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA, causados por diferentes classes de agentes mutagênicos em peixes (BELPAEME et al., 1998). Uma das vantagens do ensaio cometa é que este não depende de proliferação celular para ser realizado, portanto pode ser utilizado com qualquer tipo celular nucleado. Uma vez que substâncias genotóxicas, com frequência, são tecido-específicas, é possível analisar diretamente os tecidos-alvo (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

1.1.3 *Oreochromis niloticus*

Oreochromis niloticus (Figura 1), ou tilápia-do-nilo, é uma espécie originária do delta do Rio Nilo (Leste da África) é um peixe que pertence à família Cichlidae e está amplamente disseminado em diversos países das regiões tropicais e subtropicais do globo (CANÔNICO et al., 2005).



Figura 1- Exemplar de *Oreochromis niloticus*.

Fonte: Antônio Marques (2016)

Devido sua grande distribuição geográfica, ciclo de vida curto, possui uma ampla capacidade de conformação ambiental, colonizando assim habitats muito diversos. Vivem em ambiente bento pelágico, toleram as baixas temperaturas e variados graus de salinidade, são omnívoros (zooplâncton e fitoplâncton), procuram corpos de água doce e pelos seus hábitos alimentares ficam em contato com diversos tipos de contaminantes. (GONZÁLEZ-MILLE, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a qualidade da água do Rio Iguaçu utilizando biomarcadores genéticos em tecido sanguíneo de exemplares adultos de *Oreochromis niloticus* mantidos em condições experimentais de laboratório.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a frequência de micronúcleos e a frequência de alterações morfológicas nucleares em hemácias periféricas utilizando o teste do micronúcleo písceo;
- Avaliar possíveis danos ao DNA causados pela exposição dos espécimes à água do Rio Iguaçu por meio do ensaio cometa de eritrócitos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORGANISMO UTILIZADO

A espécie selecionada para este trabalho foi *Oreochromis niloticus*, conhecida popularmente como Tilápia do Nilo. Esta espécie está amplamente disseminada em diversos países das regiões tropicais e subtropicais do globo.

3.2 COLETA DE ÁGUA

A coleta da água foi realizada em um ponto específico do Rio Iguaçu, logo após a passagem do rio pela Cidade Industrial de Curitiba no município de Araucária - PR. Este é o ponto do rio onde a água posteriormente já passou por todas as regiões de maior atividade antrópica. A água foi armazenada em containers de 200 litros, transportados até o Laboratório de Toxicologia Celular, onde ficou por um período de 24 horas sob aeração, antes de ser utilizada nos experimentos.

3.3 ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Os exemplares (adultos) de *O. niloticus* foram obtidos na estação de piscicultura Panamá, localizada no município de Paulo Lopes, ao sul de Florianópolis (SC), sem histórico ou fontes de contaminação. Os peixes passaram por um período de aclimatação de 15 dias em tanque de 2000 litros, com temperatura controlada em 24°C, pH 7,0 com aeração e circulação d'água constantes.

3.4 BIOENSAIO

Após a aclimatação o bioensaio ocorreu então com a montagem de 12 tanques de 100 litros cada, nos quais os peixes foram distribuídos randomicamente em grupos de 10 indivíduos (machos e fêmeas na proporção de 1:1), por tanque. Foram realizadas triplicatas tanto para o grupo teste como para o grupo controle. A densidade de animais por tanque foi de um indivíduo para cada 10 litros de água. A água foi testada na forma original, sem diluição (100%) e sob duas diferentes diluições (25 e 50%), além do grupo controle negativo (CN) que recebeu água purificada através de filtros de resina e carvão ativado e de outra fonte. A cada oito dias, 50% da água foi renovada, proveniente do mesmo ponto de coleta no Rio Iguaçu. A exposição ocorreu

por um período de 72 dias correspondendo, portanto a oito renovações da água. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (8 e 16 h) com ração comercial. Todos os tanques possuíam aeração constante, além de termostato para controle da temperatura em $\pm 24^{\circ}\text{C}$.

3.5 SACRÍFICIO E COLETA DE AMOSTRAS

Após os 72 dias do início da contaminação, os animais foram anestesiados, em benzocaína 10% dissolvida em água, e eutanasiados para a coleta de tecidos. Os animais eutanasiados tinham peso médio 5.14 ± 2.53 gramas e comprimento total médio de 6.64 ± 0.80 cm.

Com o auxílio de seringa e agulha heparinizadas, foi coletado cerca de 1 mL de sangue periférico, através da artéria caudal, e 10 μL do sangue foi imediatamente adicionado em microtubo do tipo Eppendorf[®] contendo 1 mL de soro bovino fetal (SBF) para diluição, e armazenado no gelo e ao abrigo da luz. Posteriormente, esta suspensão celular foi utilizada na confecção das lâminas destinadas ao ensaio cometa em eritrócitos. Outros 10 μL do sangue foram coletados e diluídos em 10 μL de SBF para a realização do esfregaço sanguíneo, necessário para a análise do teste do micronúcleo písceo.

3.6 BIOMARCADORES GENÉTICOS

3.6.1 Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)

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

- a) Lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) Ao se coletar o sangue do animal, uma gota deste foi colocada na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, foi realizado um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina.
- d) A lâmina foi seca ao ar livre. Após a secagem, as lâminas foram fixadas em etanol 96% por 12 minutos em cubetas.
- e) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 12 minutos e lavadas em água corrente.
- f)

Com as lâminas já coradas, foram analisados 2000 eritrócitos 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, que estavam nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. Foram contabilizados também outros tipos de alterações morfológicas nucleares, como: “*Lobed*”, “*Blebbed*”, “*Notched*”, e “Binúcleo”.

3.6.2 Ensaio Cometa

A técnica utilizada foi descrita por SINGH et al. (1988) com algumas modificações realizadas por FERRARO et al. (2004) e CESTARI et al. (2004). Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose, e também a agarose de baixo ponto de fusão (LMP), segundo as seguintes etapas:

❖ **Preparo das lâminas com cobertura de agarose para ensaio cometa**

- a) Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 mL de PBS e agitado por duas horas. A mistura foi levada ao forno de micro-ondas até sua fervura e completa dissolução.
- b) Após a primeira fervura, a agarose foi mantida em temperatura ambiente. Quando solidificada completamente, foi picada e levada ao forno de micro-ondas novamente. Essa etapa foi repetida por três vezes.
- c) Ao final das etapas de fervura, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.
- d) As lâminas, previamente limpas, foram mergulhadas na agarose até a metade da porção esmerilhada, e retirado o excesso de agarose na face não esmerilhada da lâmina.
- e) As lâminas secaram em superfície plana e em temperatura ambiente *overnight*, para a completa solidificação da cobertura de agarose.

❖ **Preparo da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)**

- a) Foram dissolvidos 100 mg de agarose LMP em 20 mL de PBS.
- b) Essa solução foi fervida em forno de micro-ondas apenas uma vez.

- c) Até o momento de uso, a agarose LMP permaneceu em geladeira. Quando em uso, foi aquecida e mantida em 37°C.

3.6.3 Ensaio cometa com eritrócitos

Foram realizados os seguintes procedimentos:

- a) Da suspensão celular composta pelo sangue coletado (10 µL) e diluído em soro bovino fetal (1 mL), foi pipetado 10 µL e homogeneizado com 120 µL de agarose LMP;
- b) Esta mistura foi depositada sobre a lâmina, previamente coberta com agarose normal;
- c) Foram colocadas lamínulas cobrindo toda a superfície da lâmina, espalhando homogeneamente a suspensão celular por toda extensão laminar;
- d) Essas lâminas foram refrigeradas por pelo menos 15 minutos, para solidificar a nova camada de agarose;
- e) Após a refrigeração, as lamínulas foram gentilmente retiradas;
- f) As lâminas foram mergulhadas em cubetas contendo solução de lise e mantidas sob refrigeração por, pelo menos, 24 horas;
- g) Depois do processo de lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese. A cuba foi mantida sob refrigeração, na ausência de luz, e com uma solução de eletroforese alcalina (pH>13);
- h) As lâminas permaneceram nesta solução alcalina de eletroforese por 25 minutos, antes da corrida eletroforética, para desespiralização do DNA;
- i) Após este período, iniciou a corrida de eletroforese por 25 minutos, com as fontes configuradas para fornecer 300 mA e 1 V/cm.
- j) Ao final dos 25 minutos da corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com o tampão de neutralização (pH 7,5). O processo de neutralização ocorreu com 3 banhos de tampão a cada 5 minutos.
- k) As lâminas secaram ao ar *overnight*;
- l) Quando secas, foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos;
- m) As lâminas foram coradas somente no momento da análise. Para isso, foram adicionados 30 µL de brometo de etídio (20 mg/L – Sigma-Aldrich®) em cada lâmina, e cobertas com uma lamínula;

- n) A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Leica DMLS2, com filtro de rodamina e sob aumento de 400x.
- o) Foram analisados 100 nucleóides por animal. Os nucleóides foram classificados de acordo com o dano, de acordo com o comprimento da cauda em relação à cabeça, formadas após a corrida eletroforética. Foram atribuídos valores de classes para estes danos: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano extenso), e 4 (dano máximo), (Figura 2). A partir da classificação e quantificação dos danos foram gerados escores, através do somatório da quantidade de dano multiplicada pelo valor da classe, seguindo a fórmula:

$$ESCORE = \frac{\{(0 \times N0) + (1 \times N1) + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4)\}}{S} \times 100$$

Onde, N0~N4 = classe dos nucleóides (0, 1, 2, 3, 4) e S= número total de nucleóides analisados que foi 100 por lâmina. (COLLINS et al., 1997).

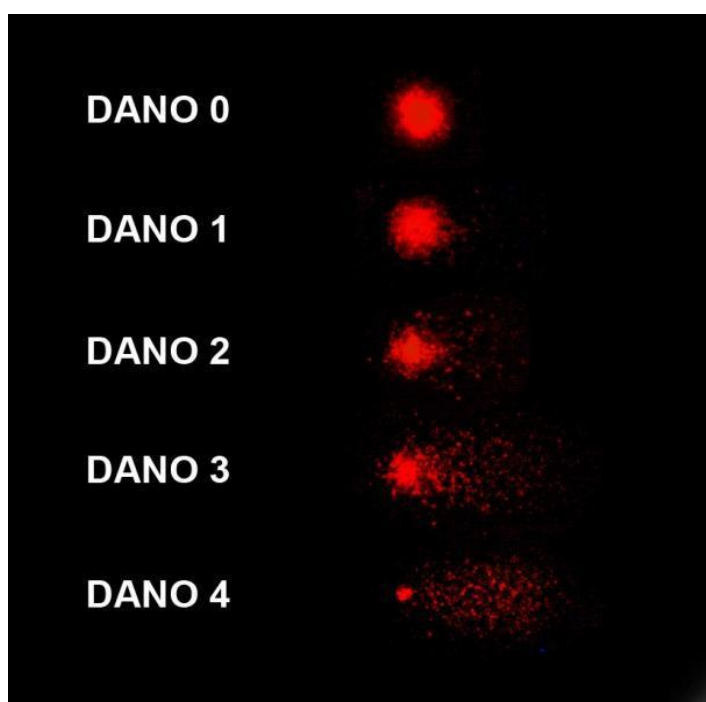


Figura 2- Modelo de Nucleóides com danos de 0 a 4, utilizado na classificação para análise do ensaio cometa.

Fonte: Tatiane Klingelfus (2013).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estatísticos foram obtidos utilizando o programa estatístico Prisma. A primeira análise realizada em todos os grupos foi através do teste de Kolmogorov-Smirnov, para testar a normalidade dos dados, e assim definir qual teste a ser utilizado (paramétrico ou não paramétrico).

Em todos os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls. Sendo significativo quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 TESTES DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS DE *Oreochromis niloticus*.

No Teste do Micronúcleo Písceo (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMNs), foram analisados 2000 eritrócitos corados com giemsa. Foram observadas as seguintes alterações morfológicas nucleares: micronúcleo, “*Blebbed*”, “*Lobed*”, “*Notched*” e “*Binúcleo*” (Figura 3). A quantidade observada de micronúcleos (total de 5 apenas) não foi relevante para a análise estatística.

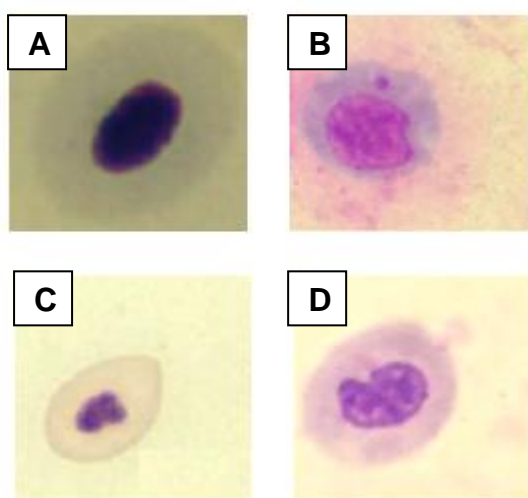


Figura 3- Eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Aumento de 1000x). Alguns exemplos de alterações morfológicas nucleares, as letras indicam: (A) célula com núcleo normal, (B) célula com micronúcleo, (C) “*Lobed*”, (D) “*Notched*”.

Fonte: o Autor (2016)

Em relação à alteração do tipo “Lobed”, não foram observadas diferenças significativas nas frequências desta AMNs (Figura 4).

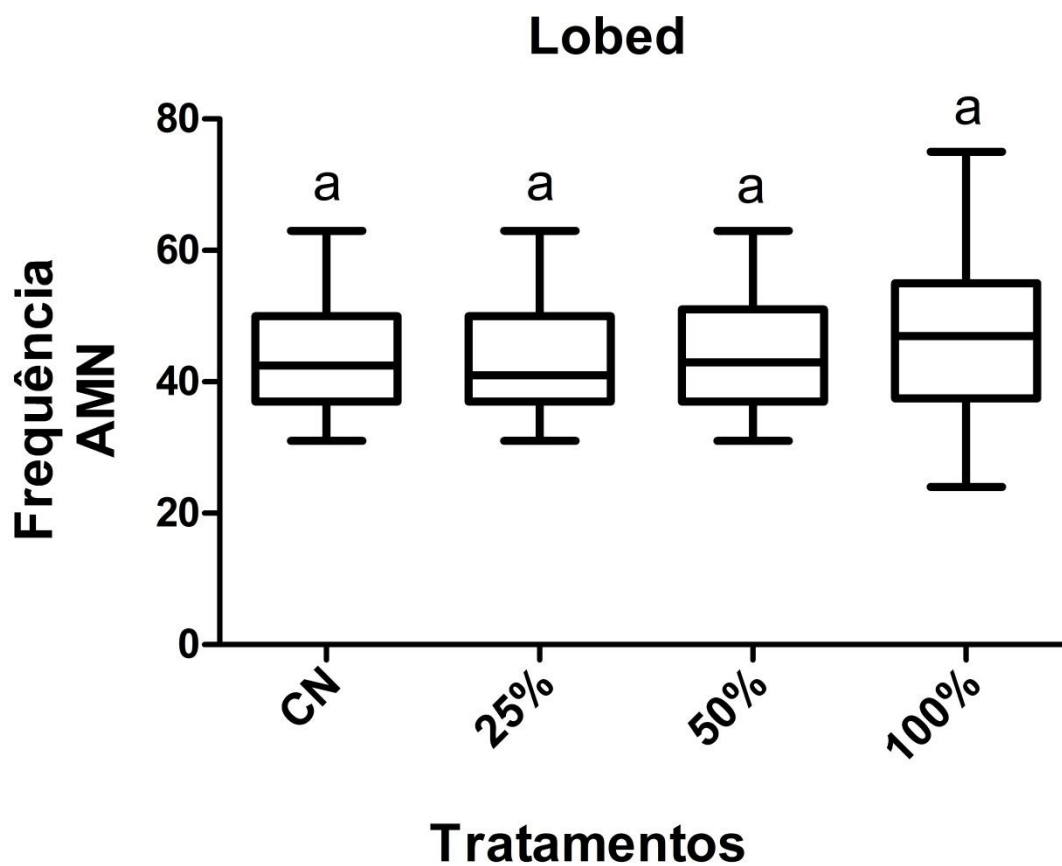


Figura 4- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológica nuclear em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, sendo este do tipo “Lobed”. Valores expressos em mediana e quartis. As letras minúsculas (a) indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos, onde a diferença considerada é: $p < 0,05$. Fonte: o autor (2016).

Quando comparadas as frequências da alteração tipo “Binúcleo”, também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5).

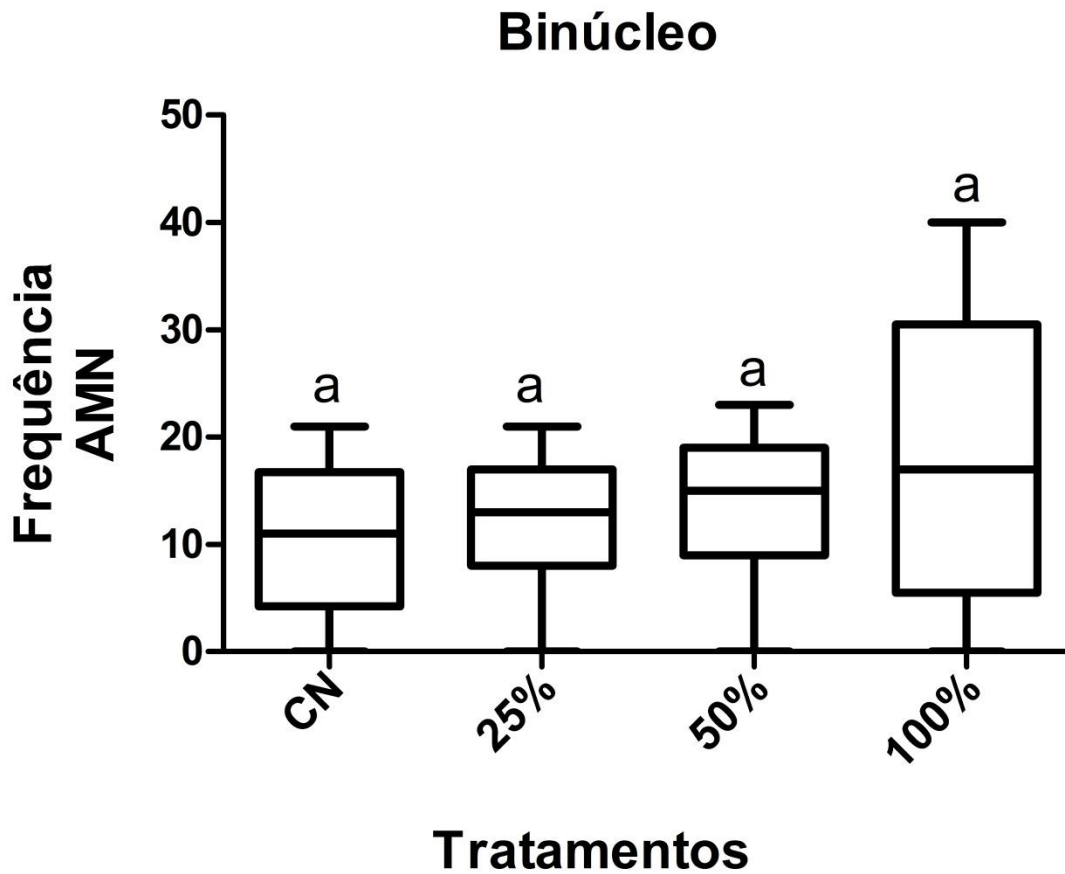


Figura 5- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológica nuclear em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, sendo este do tipo “Binúcleo”. Valores expressos em mediana e quartis. As letras minúsculas (a) indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos, onde a diferença considerada é: $p < 0,05$. Fonte: o autor (2016).

Quando comparados os tratamentos em relação a alterações do tipo “Blebbed”, foi observada diferença significativa entre o CN e todos os demais tratamentos: 25% ($p < 0.0288$), 50% ($p = 0.0001$) e 100% ($p < 0.0001$). Os tratamentos de 25% e 50% não apresentaram diferenças significativas entre si ($p = 0.1001$). Porém, o tratamento de 100% apresentou maior frequência de “Blebbed” quando comparado aos tratamentos de 25% ($p < 0.0001$) e 50% ($p = 0.0004$), (Figura 6).

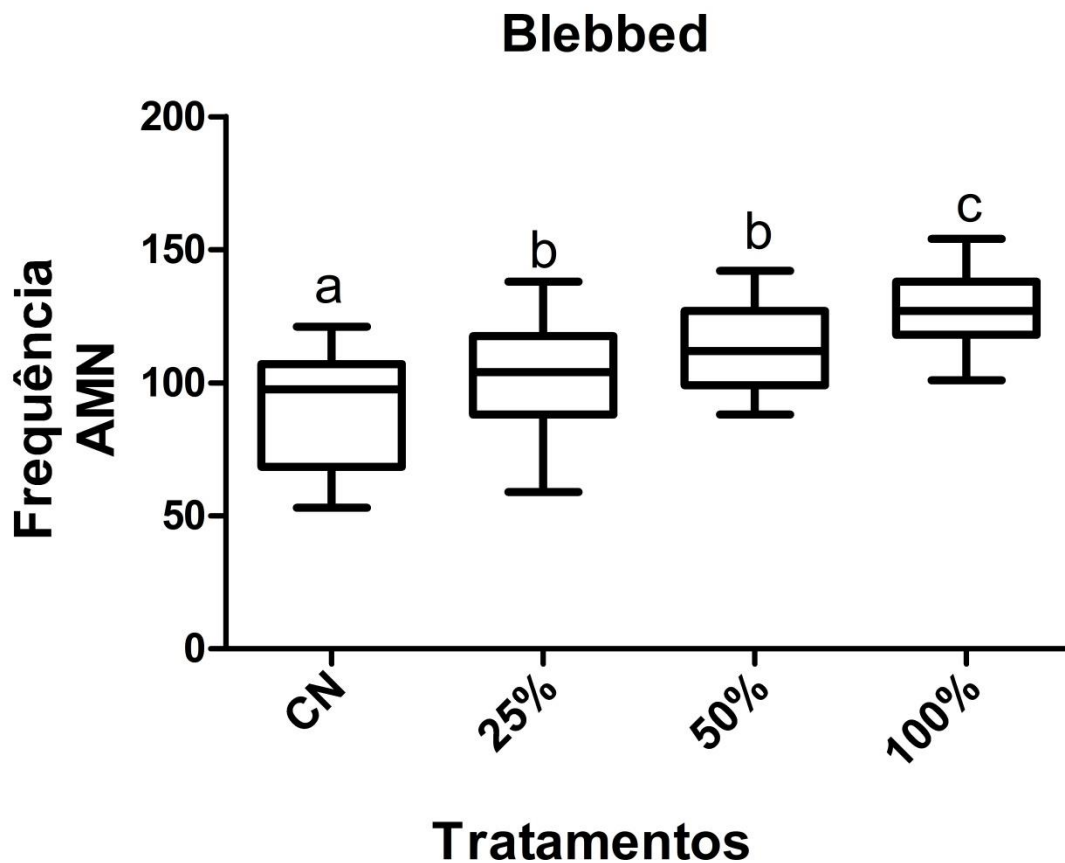


Figura 6- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológica nuclear em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, sendo este do tipo “Blebbed”. Valores expressos em mediana e quartis. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Fonte: o autor (2016).

Os tratamentos de 25%, 50% e 100% apresentaram maiores frequências de alterações do tipo “Notched” quando comparadas ao controle negativo ($p < 0.0001$). Porém, as frequências de “Notched” não diferiram entre os três tratamentos com a água do Rio Iguaçu (Figura 7).

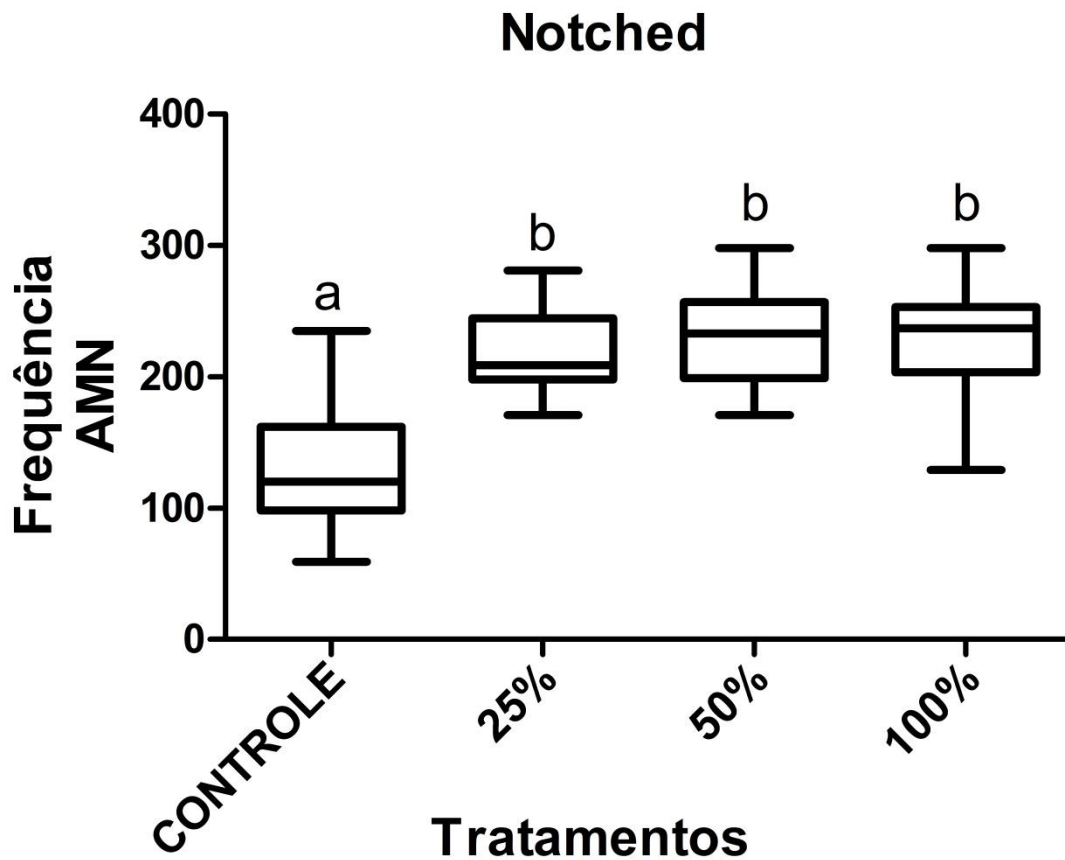


Figura 7- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológica nuclear em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, sendo este do tipo “Notched”. Valores expressos em mediana e quartis. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Fonte: o autor (2016).

Quando comparadas as AMNT (alterações morfológicas nucleares totais) (Figura 8) foi observado que o CN diferiu dos três tratamentos, 25% ($p < 0.0001$), 50% ($p < 0.0001$) 100% ($p < 0.0001$). O tratamento com 25% também diferiu dos tratamentos de 50% ($p = 0.0436$) e de 100% ($p = 0.0004$). Apenas em comparação entre 50% e 100% não houve diferença significativa ($p = 0.1119$).

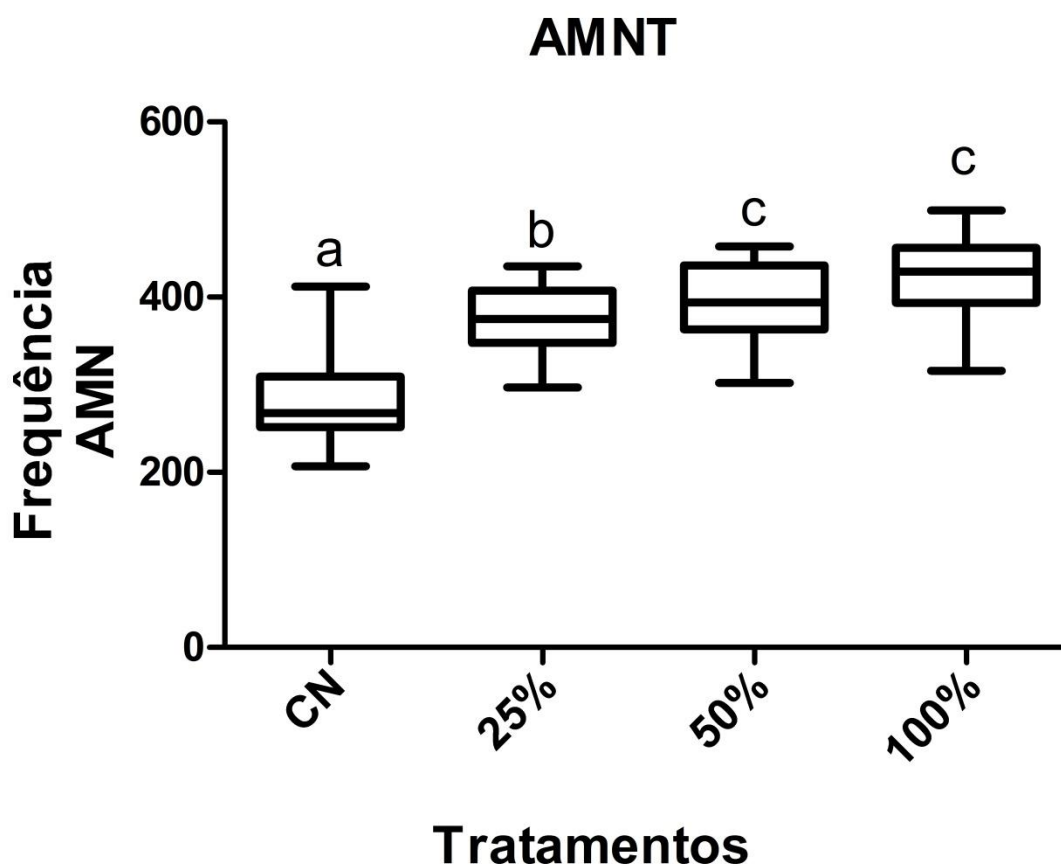


Figura 8- Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%) com relação à frequência morfológicas nucleares totais (AMNT) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, sendo elas micronúcleo, “Lobed”, “Notched”, “Blebbed” e “Binúcleo”.

Valores expressos em mediana e quartis. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Fonte: o autor (2016).

4.2 ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Oreochromis niloticus*.

O resultado do ensaio cometa mostrou uma maior quantidade de danos nos tratamentos, quando comparados com o controle negativo: 25% ($p=0.0329$), 50% ($p<0.0001$) e 100% ($p<0.0001$). Entretanto, o grupo 25% apresentou menos danos ao DNA em relação aos tratamentos com 50% ($p<0.0001$) e 100% ($p<0.0001$) da água do Rio Iguaçu. Os tratamentos com maiores frações de água do Rio Iguaçu, 50% e 100%, não diferiram entre si.

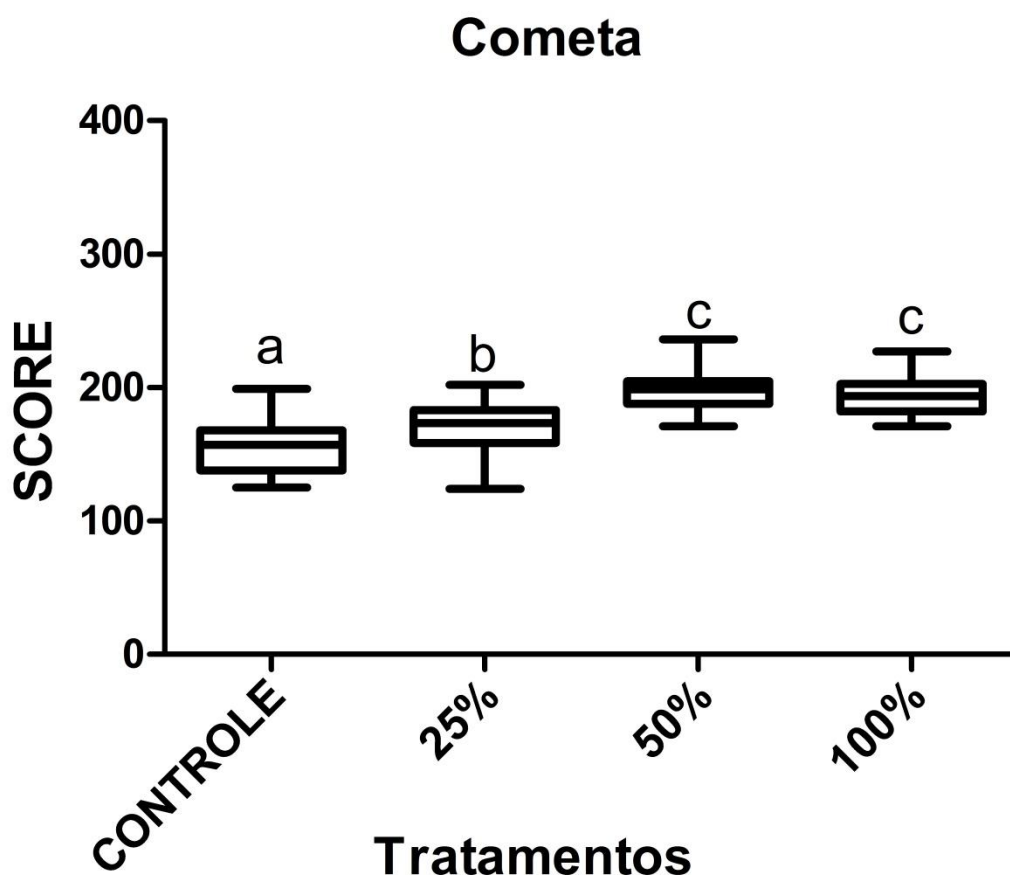


Figura 9- Danos ao DNA em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, detectados por ensaio cometa a partir do score das classes de 0 a 4. Comparação entre os tratamentos (CN, 25%, 50% e 100%).

Valores expressos em mediana e quartis. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos. Fonte: o autor (2016).

5. DISCUSSÃO

Considerando a grande importância da bacia do rio Iguaçu, é necessário que haja uma discussão com relação à necessidade de recuperação da qualidade das águas e manutenção dos afluentes deste rio, já que dificilmente encontram-se trabalhos que discutam ou avaliem o risco de exposição dos seres vivos que compõem a sua fauna ou que vivem no seu entorno. Portanto o presente trabalho pretende avaliar a exposição de espécie *Oreochromis niloticus* à água do rio Iguaçu.

Em 2005, o Instituto Ambiental do Paraná verificou a qualidade das águas do rio Iguaçu fazendo análises físico-químicas e toxicológicas. Foi assim observado, que as águas do rio Iguaçu encontram-se poluídas, de acordo com o IPCA (Índice de proteção das comunidades aquáticas) que leva em consideração o pH e toxicidade da água. Em alguns locais a água possuía qualidade “boa” ou “regular” (Curitiba) e outros locais com na região de Araucária, como “inadequada” (IAP, 2005).

As alterações morfológicas nucleares, observadas nos eritrócitos dos peixes utilizados no presente trabalho, foram do tipo micronúcleo, “*Lobed*”, “*Notched*”, “*Blebbed*”, e células binucleadas. A presença de alterações nucleares, como “*Blebbed*” e “*Notched*” devem ser consideradas como dados complementares decorrentes da indução por agentes citogenotóxicos (AYLLON & GARCIA-VAZQUEZ 2000).

Como observado no presente trabalho, algumas alterações morfológicas nucleares (“*Blebbed*” e “*Notched*”) apresentam diferença significativa quando comparamos as diferentes concentrações da água coletada do Rio Iguaçu com o controle negativo, o que indica pode indicar um potencial mutagênico desta amostra. Este potencial aumenta de forma a acompanhar o aumento da concentração da água, ou seja, da menor para a maior (25% - 100%). Este possível potencial se refletiu na análise das alterações morfológicas totais, demonstrando aumento significativo da frequência das alterações, acompanhando o aumento da concentração da água nos tratamentos. Estes resultados estão em oposição ao do IAP de 2005 quanto ao

(IPCA), que classificou as águas do rio Iguaçu como de boa qualidade ou regular.

A partir das análises dos eritrócitos submetidos ao ensaio cometa, constatou-se grande quantidade de danos ao DNA. Nossos resultados com o Ensaio cometa mostraram um aumento gradual no número de células com maiores classes de danos (3 e 4) acompanhando o aumento da concentração da água do rio nos tratamentos. Estas observações foram corroboradas os altos escores obtidos nestes grupos, que demonstraram potencial genotóxico dos tratamentos em comparação com o controle negativo. Segundo KAMMAN et al. (2001), eventos que são constatados pelo ensaio do cometa são considerados lesões potencialmente pré-mutagênicas, pois ainda podem ser reparadas pelo sistema de reparo do DNA.

Peixes são considerados bons indicadores para a detecção de contaminantes presentes nos recursos hídricos por substâncias genotóxicas (BÜCKER et al., 2006). A espécie utilizada neste estudo, embora exótica, vem sendo manipulada pelo homem há muitos anos, e também bastante usada em testes toxicológicos. Alguns trabalhos do laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal do Paraná demonstraram que a tilápia é mais resistente do que alguns peixes nativos do Brasil, para alguns tipos de biomarcadores. Apesar disto, pudemos verificar neste trabalho que *Oreochromis niloticus* respondeu aos tratamentos indicando resultados compatíveis tanto nos testes das alterações morfológicas nucleares totais quanto no ensaio cometa.

Logo, observa-se a necessidade de somar e integrar métodos mais sensíveis aos métodos tradicionais de classificação das águas para que se possa avaliar com maior eficiência os ambientes aquáticos (ROSENBERG, 1993). Aqui você pode retomar aquela ideia do IAP que não coincidem os resultados do seu trabalho com aquilo que as análises físico-químicas podem detectar. Sendo assim ressalta-se a grande necessidade do monitoramento da qualidade das águas de ambientes aquáticos com importância ecológica e socioeconômica, como é o caso do rio Iguaçu.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível demonstrar o potencial genotóxico das águas do rio Iguaçu coletadas na região de Araucária-PR, utilizando como biomarcadores, as alterações morfológicas nucleares e ensaio cometa em células eritrocitárias de *Oreochromis niloticus*.

A qualidade da água coletada na região de estudo deste trabalho, provavelmente se encontra comprometida, uma vez que diferentes diluições foram capazes de induzir um aumento significativo na frequência das alterações morfológicas nucleares dos tipos “*Blebbed*” e “*Notched*”, bem como capaz de provocar danos ao DNA, observando-se o aumento dos escores de danos nos organismos expostos.

REFERÊNCIAS

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.

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

BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. **Ciência e Cultura**, v.45, p.10-11, 1993.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415 (3), p. 167-184, 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.

BICKHAM, J.W.; Sandhu, S.; Hebert, P.D.N.; Chikhi, L.; Athwal, R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**. Nº 463. p. 33-51.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, Manaus, v.36, n.3, p.357-364, 2006.

CÂNONICO GC, ARTHINGTON A, McCRARY JK, THIEME ML. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. **Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystem.**; v.15, p. 463-483.2005.

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. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CESTARI, M.M.; LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A.O.; COSTA, J.R.M.A.; PELETIER, E.; FERRARO, M.V.; MANTOVANI, M.S.; FENOCCHIO, A.S. Genetic damage induced by trophic doses of lead evaluated by means of the comet assay and chromosomal aberrations in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n.2, p. 270-274, 2004.

COLLINS, A; DUŠINSKÁ, M; FRANKLIN, M; SOMOROVSKÁ, M; PETROVSKÁ, H; DUTHIE, S; FILLION, L; PANAYIOTIDIS, M; RAŠLOVÁ, K; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30(2), p.139-146, 1997.

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 aberrações cromossômicas**
Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Curitiba, 2003.

GALLOTTA, F.D. C; CHRISTENSEN, J. H. Source identification of petroleum hydrocarbons in soil and sediments from Iguaçu River Watershed, Paraná, Brazil using the CHEMSIC method (CHEMometric analysis of Selected Ion Chromatograms). **Journal of Chromatography a**, vol. 1235, p.149-158, 2012.

GONZÁLEZ-MILLE, D. J., Ilizaliturri-Hernández CA, Espinosa-Reyes G, Costilla Salazar R, Díaz-Barriga F, Ize-Lema I, Mejía-Saavedra J. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. **Ecotoxicology**, vol. 19, no 7, p. 1238-1248, 2010.

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

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

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

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (2005). Monitoramento da qualidade das águas dos rios da região metropolitana de Curitiba, no período de 2002 a 2005. Curitiba: IAP.

IBGE: Instituto brasileiro de geografia e estatística. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Diretoria de Geociências. Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. Coordenação de Geografia/Indicadores de Desenvolvimento Sustentável Brasil 2010. Dimensão ambiental – **Água doce. Qualidade de águas interiores**, cap. 11, Rio de Janeiro. 2010.

KAMMAN, U., BUNKE, M. & STEINHART, H. 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, 498: 61-77.

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

MACH, K.; Mantrandrea, M. **Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability**. Cambridge, New York, NY: Cambridge University Press, 2014.

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.

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.

OSTLING, O; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.123, n°1, p.291-298, 1984.

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

ROSENBERG, D.M. & RESH, V. 1993. (Orgs.) Freshwater Biomonitoring and benthic macroinvertebrates. **Chapman & Hall**. 488 p.

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.

SOUZA, I., DUARTE, I., PIMENTEL, N.,. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**, 180, 136–144, 2013.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M. Jr.; Bergman, H.L. Biomarkers. **Biochemical, Physiological, and Histological markers of antropogenic stress**. Eds. Lewis Publishers, p.235-334, 1992.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and

metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.199, p.2467-2475, 1996.

ZAGATTO, P.A. 1998. **Significado dos estudos de validação de testes de toxicidade:** resultados publicados. In: CONGRESSO DE ECOTOXICOLOGIA. Itajaí-SC

W.H.O. World Health Organization. 1993. International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles**. Geneva.

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**, v. 375, p.125-136, 1997.