

WANESSA RAMSDORF

**UTILIZAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*)
COMO BIOINDICADORES DE REGIÃO CONTAMINADA POR AGROTÓXICO
(FAZENDA CANGÜIRI – UFPR)**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Margarete Cestari

Co- Orientador: Prof. Msc. Marcos Vinicius M.
Ferraro

**CURITIBA
2007**

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Marta Margarete Cestari por seu incentivo, confiança, apoio, ajuda e amizade e também pelos anos de ótima convivência.

Ao meu co-orientador Marcos por sua tão valiosa amizade, seu bom humor além de toda colaboração nas coletas e na realização deste trabalho.

Aos professores da banca de avaliação, Prof. Dr. Roberto Artoni, que tanto me ajudou com seus conselhos e imensa sabedoria, Profa. Dra. Marina de Almeida, pela ajuda nas análises estatísticas e ao Prof. Dr. Alberto Fenocchio pela sua avaliação.

Ao Dr. Vinicius Abilhoa pela valiosa colaboração na identificação dos lambaris.

Ao Sr. Wagner do Parque Ecológico Costa e aos funcionários da Fazenda Cangüiri, que permitiram a realização das coletas.

Aos meninos do laboratório, simplesmente indispensáveis nas coletas: Felipe, Rafa, Marcos e Thiago. Sem vocês, eu não teria uma dissertação!

À todos os meus amigos do Laboratório de Citogenética Animal: Thaís, Rafa, Felipe, Roger, Cristina, Ana Paula, Taynah, Nédia, Íris Patrícia, Luís, Laercio e Rayana e também os que já passaram por lá, Adriano e Thiago. Vocês fizeram disso tudo muito mais divertido!

Aos meus pais Paulo e Marly, aos meus irmãos e à minha prima Victória.

Aos meus amigos da Bio: Shay, Lê, Zé, Edi, Mário, Flá, Carol, Michele, Léo, Felipe, Jeferson, Rodrigo, Fábio, Pati, Bruno, Cíntia, Jean, Vivi, Flávia, Felipe, Letícia, Krebs, Jeane, João, Hugo e Tchaka e também aos não biólogos Bob e Juberson.

Aos professores do Dpto de Genética: Karam, João Carlos, Iglénir e Ives e também ao Professor Erasto, pessoa muito importante na minha maneira de ver o mundo.

Aos alunos do PPG-GEN: Lizi, Fernanda, Fabi, Márcio, Marcos, Gustavo, Fábio, Paty, Rafaelito, e João Fowler.

Às secretárias do Dpto de Genética Valéria e Luciana, e a todos os funcionários especialmente D. Adenir e D. Izolde.

Ao Prof. Ciro e alunos do laboratório de Toxicologia Aquática – Dpto Biologia Celular.

E à CAPES pela concessão da bolsa.

“O mundo está cheio de mistérios. A vida é um.”

J.B.S. Haldane (1932)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Bioensaios e Biomonitoramento	10
1.1.1 Biomonitoramento	11
1.1.2 Bioensaios.....	16
1.2 Testes para o monitoramento de Genotoxicidade Ambiental	19
1.2.1 Teste do Micronúcleo Písceo	19
1.2.2 Ensaio Cometa	26
1.3 Caracterização das áreas de estudo.....	32
1.3.1 Fazenda Experimental Cangüiri – Universidade Federal do Paraná	32
1.3.2 Parque Ecológico Costa – Curitiba (PR)	38
1.4 Químico utilizado no bioensaio – Sulfato de cobre (CuSO ₄)	39
1.5 O Gênero <i>Astyanax</i>	42
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Animais experimentais	48
4.2 Biomonitoramento	49
4.3 Bioensaio	50
4.4 Biomarcadores	51
4.4.1 Teste do Micronúcleo Písceo	52
4.4.2 Ensaio Cometa	52
4.4.2.1 Ensaio Cometa com Sangue	54
4.4.2.2 Ensaio Cometa com células de Fígado e de Rim	55
4.4.3 Análise estatística	56

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Biomonitoramento	57
5.1.1 Coletas realizadas	58
5.1.2 Comparação entre os locais de coleta	60
5.1.3 Comparação entre os locais nas diferentes coletas	65
5.1.4 Comparação entre as diferentes épocas de coleta	70
5.1.4.1 Coletas na Fazenda Cangüiri	71
5.1.4.2 Coletas no Parque Ecológico Costa	74
5.1.5 Comparação de respostas entre as duas espécies	78
5.2 Bioensaio	83
5.2.1 Comparação entre os grupos controle e tratados com sulfato de cobre	84
5.2.2 Comparação entre espécies	87
6. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
7. APÊNDICES	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS NA ÁREA DE BIOMONITORAMENTO, DANDO ÊNFASE AOS ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE	14
TABELA 02 – RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS COM BIOENSAIOS, COM ÊNFASE AOS TESTES DE GENOTOXICIDADE USANDO DIFERENTES ORGANISMOS-TESTE	17
TABELA 03 – PRECIPITAÇÃO MÉDIA MENSAL (EM MM) PARA A ESTAÇÃO PLUVIOMÉTRICA PIRAQUARA – PR, NO PERÍODO DE 2001 A 2003	73
TABELA 04 – MEDIANAS ENCONTRADAS ATRAVÉS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES NOS PEIXES COLETADOS NA FAZENDA CANGUIRI (ABR/05, NOV/05, ABR/06)	74
TABELA 05 – MEDIANAS ENCONTRADAS ATRAVÉS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES NOS PEIXES COLETADOS NO PARQUE COSTA (FEV/05, OUT/05, FEV/06)	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – FAZENDA EXPERIMENTAL DO CANGUIRI- NOV/05.....	33
FIGURA 02 – REGIÃO DE ABRANGÊNCIA DA APA DO IRAÍ	34
FIGURA 03 – MAPA DA REGIÃO DA APA DO IRAÍ COM SUAS SUBBACIAS. DESTAQUE PARA A REGIÃO DA FAZENDA CANGUIRI APRESENTANDO CONTAMINAÇÃO COM AGROQUÍMICOS ...	36
FIGURA 04 – VISTA AÉREA DAS LAGOAS DO PARQUE ECOLÓGICO COSTA	38
FIGURA 05 – EXEMPLAR DE <i>Astyanax sp B</i>	46
FIGURA 06 – EXEMPLAR DE <i>Astyanax altiparanae</i>	46
FIGURA 07 – COLETA REALIZADA NA FAZENDA CANGUIRI COM REDE DE ARRASTO MALHA 0,8 CM ENTRE NÓS. NOV/05	49
FIGURA 08 – BIOENSAIO COM SULFATO DE COBRE, REALIZADO COM A ESPÉCIE <i>Astyanax sp B</i> – SISTEMA DE AQUÁRIOS DO LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA ANIMAL E MUTAGÊNESE AMBIENTAL – UFPR	51
FIGURA 09 – COMPARAÇÃO ENTRE OS LOCAIS DE COLETA (PARQUE COSTA E FAZENDA CANGÜIRI) REALIZADA ATRAVÉS DE MEDIANA DOS DIFERENTES BIOMARCADORES ANALISADOS NA ESPÉCIE <i>Astyanax sp B</i>	60
FIGURA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE OS LOCAIS DE COLETA (PARQUE COSTA E FAZENDA CANGÜIRI) REALIZADA ATRAVÉS DE MEDIANA DOS DIFERENTES BIOMARCADORES OBSERVADOS NA ESPÉCIE <i>Astyanax altiparanae</i>	61
FIGURA 11 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE OS LOCAIS DE COLETA - COLETA 1 (FEV/05 E ABR/05) BIOMONITOR: <i>Astyanax sp B</i>	66

- FIGURA 12** – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE OS LOCAIS DE COLETA - COLETA 2 (OUT/05 E NOV/05) BIOMONITOR: AS DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax*..... 67
- FIGURA 13** – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE OS LOCAIS DE COLETA - COLETA 3 (FEV/06 E ABR/06) BIOMONITOR: AS DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax*..... 68
- FIGURA 14** – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIO COMETA COM CÉLULAS DE SANGUE, DE FÍGADO E DE RIM) NAS COLETAS REALIZADAS NA FAZENDA CANGUIRI, DESCONSIDERANDO AS ESPÉCIES 74
- FIGURA 15** – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIO COMETA COM SANGUE E TECIDOS HEPÁTICO E RENAL) NAS COLETAS REALIZADAS NO PARQUE COSTA, DESCONSIDERANDO AS ESPÉCIES 77
- FIGURA 16** – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIO COMETA COM CÉLULAS DE SANGUE, DE FÍGADO E DE RIM) ENTRE AS ESPÉCIES *Astyanax altiparanae* e *Astyanax sp B* COLETADOS NA FAZENDA CANGUIRI – ABR/06 80
- FIGURA 17** – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIO COMETA COM CÉLULAS DE SANGUE, DE FÍGADO E DE RIM) ENTRE AS ESPÉCIES *Astyanax altiparanae* e *Astyanax sp B* COLETADOS NO PARQUE COSTA – FEV/06 80

- FIGURA 18** – NÚCLEOS DOS ANIMAIS COLETADOS NA FAZENDA CANGUIRI. OBSERVAM-SE EM: a – NÚCLEO NORMAL; b, c, d E e – NÚCLEOS COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS; f E g – PRESENÇA DE MICRONÚCLEO 81
- FIGURA 19** – SEÇÕES DE LÂMINAS COM CÉLULAS DE SANGUE SUBMETIDAS AO ENSAIO COMETA, APRESENTANDO (a) ELEVADOS GRAUS DE DANOS E (b) BAIXOS GRAUS DE DANO 82
- FIGURA 20** – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE INDIVÍDUOS CONTROLES E CONTAMINADOS DE *Astyanax sp B* 86
- FIGURA 21** – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE INDIVÍDUOS CONTROLES E CONTAMINADOS DE *Astyanax altiparanae* 87
- FIGURA 22** – COMPARAÇÃO ENTRE ESPÉCIES (*Astyanax sp B* e *Astyanax altiparanae*) NOS INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE COBRE (0,25 mg/L) POR 72 HORAS..... 88

RESUMO

A poluição dos ecossistemas aquáticos pode provocar a perda da biodiversidade. Dessa forma, estudos de monitoramento são fundamentais, pois a saúde dos peixes reflete a qualidade e a sustentabilidade destes ecossistemas, bem como dos indivíduos que deles fazem uso. Foram utilizados os biomarcadores de genotoxicidade: teste de micronúcleo písceo, ensaio cometa com sangue, células do fígado e células do rim em *Astyanax sp B* e *A. altiparanae*. Os objetivos deste trabalho foram: analisar o grau de contaminação ambiental na Fazenda Cangüiri através de biomonitoramento e verificar diferenças de respostas entre as espécies do gênero. Também foi conduzido bioensaio com sulfato de cobre para verificar o efeito desse composto no material genético das espécies e comparar as respostas destas frente ao químico. A Fazenda Cangüiri apresentou maior grau de contaminação do que o Parque Ecológico Costa quando as espécies de *Astyanax* foram utilizadas conjuntamente. A espécie *A. sp B* se mostrou mais sensível, indicando diferentes graus de contaminação entre as localidades amostradas. Quanto à sensibilidade dos biomarcadores, o ensaio cometa apresentou-se mais sensível que o teste do micronúcleo písceo. No bioensaio foi utilizado sulfato de cobre (0,25 mg/L, 72 horas) para ambas as espécies. *Astyanax sp B* mostrou diferença significativa entre os grupos controle e contaminado nos testes do micronúcleo písceo e ensaio cometa com sangue, o que não ocorreu no ensaio cometa com as células do fígado e do rim. O curto tempo de exposição ao xenobionte ao qual os indivíduos ficaram expostos pode ter originado essa diferença. Ao utilizar a espécie *Astyanax altiparanae* nenhum dos biomarcadores detectou diferença entre os grupos controle e contaminado. Esses resultados sugerem que *Astyanax altiparanae* é resistente ao agente xenobionte na concentração analisada. Ao compararmos as respostas para as duas espécies, no ensaio cometa com sangue e com tecido renal observou-se diferença de resposta entre as duas espécies sendo a espécie *Astyanax sp B* mais sensível, confirmando os resultados observados no biomonitoramento. Devido à melhores respostas, tanto em campo como em bioensaio, e também devido à sua abundância e maior facilidade de manutenção em laboratório, sugere-se que *A. sp B* seja um melhor biomonitor que *A. altiparanae*.

ABSTRACT

The pollution of aquatic environments may cause biodiversity loss. Thus, monitoring studies are crucial since the health of fishes reflects the quality and sustainability of these environments and other surrounding individuals. These genotoxicity biomarkers were used in the present report: Piscine Micronucleus Test, Comet Assay with blood, liver and kidney cells in *Astyanax sp B* and *A. altiparanae*. Analyze the environmental contamination degree on the Cangüiri Farm through biomonitoring and verify response differences among the species of the genus were the objectives of this study. A bioassay with copper sulfate to verify the effect of this component on the genetic material of the species and compare fish responses was performed. The Cangüiri Farm presented a higher contamination degree than the Costa Ecologic Park when the species of *Astyanax* were used together. The specie *A. sp B* was more sensitive, indicating different contamination degrees among the studied places. Concerning the biomarkers' sensibility, Comet Assay was more sensitive than the Piscine Micronucleus Test. Since the fishes from the Farm are used for human consumption, these results cause serious concerns. Copper sulfate (0,25 mg/L, 72 hours) was used in the bioassay for both species. *Astyanax sp B* showed a significant difference between control and contaminated group in the Piscine Micronucleus Test and Comet Assay with blood, but the same was not observed in the Comet Assay with liver and kidney cells. The short exposure time to the xenobiont may have caused this discrepancy. For *Astyanax altiparanae* none of the biomarkers detected differences between control and contaminated groups. These results suggest *Astyanax altiparanae* is resistant to the xenobiont in the analyzed concentration. Comparing the responses for both species, in the Comet Assay with blood and with kidney tissue there was a difference between the two fishes. *Astyanax sp B* was more sensitive, confirming the results observed in the biomonitoring. Due to better responses, both in field and in the bioassay, and also due to abundance and facility in laboratory handling, we suggest that *A. sp B* is a better biomonitor than *A. altiparanae*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui extensas redes fluviais, por onde fluem cerca de $257.790 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ de água passíveis de utilização, correspondendo a aproximadamente 18% do potencial hídrico superficial utilizável do planeta (SETTI, 1998), além de possuir amplos aquíferos subterrâneos, com cerca de 112.000 km^3 de volume de água (MOTTA, 1997). Os mananciais para abastecimento público no Brasil têm apresentado uma crescente e progressiva deterioração quanto à qualidade de suas águas. Estudos realizados em diferentes regiões do país (ANDREOLI et al., 1999; REBOUÇAS, 1999) dão conta de que a demanda do consumo de água tem aumentado significativamente e a disponibilidade hídrica em condição de utilização para fornecimento à população não tem crescido na mesma proporção (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005).

Segundo BARROS, SILVA e SOSA (2005) as principais causas da deterioração das bacias hidrográficas e, conseqüentemente, dos mananciais, são: desmatamentos, falta de conservação dos solos nas pastagens, lavouras e estradas, assoreamento, introdução de descargas de agrotóxicos, poluição por esgotos e lixo domésticos e hospitalares, esgotos industriais e da agricultura (por agrotóxicos e suas embalagens) e a expansão urbana, com a ocupação desordenada do solo, sem planejamento ambiental ou urbano adequado. O crescimento físico das cidades em direção aos mananciais tem causado sérios transtornos, muitas vezes exigindo seu deslocamento para outras áreas. Inúmeros mananciais vêm sofrendo grande pressão e outros tantos estão sendo degradados a ponto de serem extintos, principalmente nas proximidades das grandes cidades ou metrópoles.

Estes fatores e seus efeitos não ocorrem de forma isolada, havendo uma inter-relação dos fatores urbanos, industriais e rurais na degradação dos mananciais e conseqüentemente na qualidade da água (BARROS; SILVA; SOSA, 2005).

Grande parte dos centros urbanos utiliza represas de forma direta ou indireta para captação da água bruta. Esses reservatórios são ambientes lacustres resultantes do barramento artificial de cursos d'água, criados normalmente com o objetivo de armazenamento de água e contenção de cheias, regularizando a vazão e a disponibilidade de água nos rios próximos aos centros urbanos (VON SPERLING,

1999). Normalmente localizam-se em áreas que vêm sendo pressionadas de forma crescente pela expansão urbana irregular, falta de infra-estrutura básica (saneamento e lixo) e degradação do solo em suas bacias hidrográficas (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005).

Esses fatores associados às características intrínsecas destes novos ambientes têm induzido problemas crescentes na qualidade da água para abastecimento público, com acúmulo de poluentes e desenvolvimento de organismos como algas, que são potencialmente produtores de toxinas (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005).

Durante as três últimas décadas têm aumentado o interesse da comunidade científica e das agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). Este interesse foi intensificado em razão do constante crescimento populacional e o conseqüente aumento da industrialização, bem como a utilização inadequada de recursos naturais.

Dentre as diferentes substâncias químicas produzidas pela humanidade, apenas uma pequena parcela tem sido testada quanto aos seus efeitos nos seres vivos. Estudos têm sido efetuados nos últimos anos para melhor se compreender o papel de muitas destas substâncias 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 (FERRARO, 2003).

Estudos sobre a toxicidade de substâncias e elementos químicos se revestem, dessa forma, de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo a esta contaminação, permitindo avaliar o impacto e o efeito sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (PANDRANGI et al., 1995). Os padrões de acumulação de xenobióticos são diferentes para distintos organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e as taxas de metabolização e eliminação dos compostos químicos.

O ambiente aquático é um meio invariavelmente atingido pelos poluentes ambientais. Isto pode ocorrer pela evaporação e posterior precipitação, ou pelo escoamento superficial ou despejo direto de efluentes nos corpos d'água. Este

ambiente está, dessa forma, exposto a processos de poluição causados pela grande variedade e quantidade de substâncias químicas que nele ingressam. Estas substâncias, que podem ser produzidas pelo homem ou de origem natural, são chamadas de “xenobióticos” e sua quantidade e variedade estão em contínuo aumento (LIVINGSTONE, 1993; 1998).

Poluição ambiental aquática é um sério e crescente problema (SASAKI et al., 1997a), visto que o elevado número de químicos industriais, agrícolas e comerciais leva a vários efeitos deletérios nos organismos (McGLASHAN; HUGHIES, 2001), colocando em risco a sobrevivência e fisiologia dos organismos (HANDY, 1994) e podendo também induzir alterações genéticas (FABACHER et al., 1991), que pode resultar em mutações (DE FLORA; BAGNASCO; ZANACCHI, 1991) e/ou carcinogênese (FOLMAR et al., 1993).

Muitas das substâncias químicas lançadas ao ambiente são 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 às aneuploidias. Outras são chamadas de clastogênicas e induzem quebras e alterações na estrutura dos cromossomos. Em qualquer dos casos é possível, através de testes citogenéticos, avaliar os efeitos mutagênicos de um determinado composto, o que torna estes tipos de testes imprescindíveis nestas avaliações (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

A ciência busca entender a interação dos xenobióticos com a vida aquática. Dentro deste contexto, surgiu a ecotoxicologia, ciência que identifica e avalia os efeitos causados pela presença de xenobióticos no ecossistema. A partir dos resultados de pesquisa nesta área passou-se a indicar se a concentração de um determinado poluente seria capaz de exercer ou não efeitos deletérios sobre uma comunidade específica (HUGGETT et al., 1992).

A introdução de substâncias tóxicas no ambiente aquático além de causar efeitos locais e imediatos, pode levar a alterações sistêmicas como a contaminação de bacias hidrográficas e o comprometimento de reservatórios subterrâneos através da infiltração pelo solo. Assim, a comunidade aquática, bem como as comunidades que

fazem uso dos recursos hídricos podem ser expostas e sofrer efeitos de contaminação crônica (THOMPSON; LANGTON; HART, 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; METCALFE, 1995).

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 em níveis tróficos superiores (DE LEMOS; TERRA, 2003).

Avaliar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais por si só não é suficiente, havendo a necessidade de se detectar e avaliar o impacto destes poluentes nos organismos expostos, devido ao fato de existirem diferenças na forma de metabolizar os xenobióticos. Para se poder detectar e avaliar os efeitos biológicos, utiliza-se o estudo e o desenvolvimento de biomarcadores.

LIVINGSTONE (1993) considera como biomarcadores os fluídos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes. Também considera como biomarcadores as respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos. Existem assim, biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes.

Dentre os diversos biomarcadores, podemos examinar a biotransformação de enzimas (fase I e II), parâmetros de estresse oxidativo, produtos de biotransformação, metalotioneínas, proteínas MXR (proteínas de resistência multixenobiótica), parâmetros imunológicos, reprodutivos ou endócrinos, parâmetros genotóxicos, neuromusculares, fisiológicos, histológicos e morfológicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Os biomarcadores podem ser de susceptibilidade, de exposição ou de efeito. Os biomarcadores de susceptibilidade indicam a habilidade inerente ou adquirida de um organismo em responder ao desafio da exposição a uma substância xenobiótica específica, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a

susceptibilidade de um organismo a essa exposição (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os biomarcadores de exposição podem ser definidos como algum xenobiótico, seus metabólitos ou produtos da interação entre o xenobiótico e uma molécula ou célula que é medida nos organismos ou nas subunidades destes (DEPELDGE; AAGAARD; GYÖRKOS, 1995; LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998). Biomarcadores de efeito representam alguma alteração química, fisiológica, comportamental ou outra que pode modificar o bem-estar de um organismo. Diversos componentes moleculares e celulares em diferentes espécies de peixes têm sido usados como biomarcadores de exposição e efeito, incluindo parâmetros bioquímicos, imunológicos e genéticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), sendo que dentre os marcadores genéticos podemos incluir a análise da frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares, quebras cromossômicas e quebras e alterações na fita de DNA.

Biomarcadores podem ser identificados nos níveis bioquímico, celular, individual, populacional, de comunidade ou de ecossistema. Porém, é nos níveis organizacionais mais básicos, nas respostas bioquímicas e moleculares, que os efeitos iniciais dos poluentes são observados. Nestas situações as alterações dos poluentes podem ser reversíveis, de forma que medidas preventivas possam ser tomadas evitando o comprometimento mais severo do ambiente. Esses marcadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos devem ser capazes de indicar diferentes respostas à presença de estressores distintos (HUGGETT et al., 1992).

A utilização de biomarcadores para detecção de contaminação ambiental iniciou-se no Brasil no final dos anos 90 (BAINY; WOODIN; STEGEMAN, 1999). Vários autores vêm explorando o assunto, colaborando para a padronização de diversos biomarcadores em espécies nativas (LEITÃO et al., 2000).

Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos. Se a resposta for positiva, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por esta razão biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação (WALKER et al., 1996).

Atualmente ambientes aquáticos como rios, estuários, lagoas e oceanos próximos a grandes cidades recebem seus esgotos e efluentes industriais. Estes efluentes têm sido agrupados de acordo com sua origem industrial, sendo a maioria composta por químicos e derivados, efluentes das indústrias de papel e munições, refinarias de petróleo, indústrias de metais primários e outros (HOUK, 1992). Outros tipos de poluentes recebidos em ambientes aquáticos são originados na agricultura e na extração de recursos minerais.

Dentre os principais organismos utilizados como biomonitores estão espécies de moluscos, peixes, anfíbios, mamíferos (COTELLE; FERARD, 1999) e algas (AOYAMA; IWAHORI; MIYATA, 2003). O amplo uso de peixes é explicado pela resposta a tóxicos de maneira similar aos grandes vertebrados, podendo assim, serem utilizados para analisar potenciais carcinogênicos e teratogênicos em humanos. Peixes indicam o potencial de exposição de populações humanas a genotóxicos químicos e também estão entre os maiores veículos de transferência de contaminantes para humanos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Os peixes, assim como os mamíferos, 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).

Organismos aquáticos acumulam poluição diretamente através da água contaminada ou indiretamente pela alimentação (SASAKI et al., 1997a) e, sabidamente, existe uma grande quantidade de químicos mutagênicos com elevada probabilidade de induzir efeitos carcinogênicos em várias espécies de peixes (MINISSI; CICCOTINI; RIZZONI, 1996).

Poluentes genotóxicos afetam não somente os organismos aquáticos mas também todo o ecossistema e, no final, humanos através da contaminação de alimentos (RAJAGURU et al., 2002). Alimentos são o modo mais comum para exposição de populações humanas a tóxicos químicos, sendo que peixes e crustáceos são reconhecidamente os maiores veículos nessa transferência de contaminantes aos

humanos. Dessa forma, peixes também são úteis podendo agir como organismos sentinela para indicar o potencial para exposição de populações humanas a substâncias genotóxicas presentes na água. Peixes marinhos e crustáceos, que constituem importante fonte de proteínas em muitos países, se apresentaram contaminados com altas concentrações de metilmercúrio em estudos realizados por WHO (1990). Também foi verificada a indução de danos cromossômicos em linfócitos de pessoas expostas ao metilmercúrio através do consumo de peixes contaminados (SKERFVING et al., 1974).

As espécies marinhas que se alimentam de detritos são especialmente importantes em estudos de poluição, tendo em vista que os sedimentos se apresentam impregnados por contaminantes antropogênicos e podem agir como importante fonte de poluição para organismos habitantes de fundo (KAMMANN et al., 2000). O potencial de efeitos genotóxicos em organismos aquáticos expostos a poluição é ainda pouco conhecido, embora a contaminação de sedimento com elevadas concentrações de PHA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) já tenha sido associada com elevadas prevalências de tumores em peixes habitantes de fundo (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

A interação de compostos genotóxicos, como PHA e metais pesados, com o DNA inicialmente provoca trocas estruturais na molécula de DNA, isto é, ligação covalente do composto a bases e fosfatos do DNA, alteração de bases, e formação de quebras da fita de DNA (FLAMMARION et al., 2002). Os efeitos dos poluentes na integridade do DNA têm sido reportados em animais aquáticos e, particularmente, em peixes (MALINS et al., 1985; VARANASI et al., 1989).

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. SANCHEZ-GALAN; LINDE e GARCIA-VAZQUEZ (1999) verificaram a sensibilidade de *Salmo trutta* ao cádmio e ao mercúrio com a indução de aumento significativo da frequência de micronúcleos após injeção peritoneal, enquanto que a espécie *Phoxinus phoxinus* apresentou-se sensível somente ao cádmio. Em outro trabalho similar, AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2000) verificaram que a espécie *Poecilia latipinna* apresentou-se sensível ao cádmio e ao

mercúrio, enquanto que *Phoxinus phoxinus* não foi sensível ao mercúrio. Esse resultado sugere que *P. latipinna* pode ser usado em testes de genotoxicidade de metais pesados, ao contrário do *P. phoxinus*, menos sensível aos metais pesados, especialmente aos sais de mercúrio.

LEMOS et al. (2005), verificaram a adequação da espécie *Tilapia rendalli* como bioindicadora de genotoxicidade. Através do ensaio cometa, essa espécie foi capaz de indicar a toxicidade de um lago, comprovando, assim, os resultados obtidos no teste do micronúcleo písceo por GRISOLIA e CORDEIRO (2000). Estes autores, ao trabalharem em bioensaios com ciclofosfamida e mitomicina, verificaram maior sensibilidade de *T. rendalli* do que *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*. A espécie *T. rendalli* é encontrada freqüentemente no ambiente natural, porém é oriunda de introduções acidentais (SEVERI; CORDEIRO, 1994) e intencionais a partir de atividades de “peixamento” de lagos artificiais. Esta espécie está presente no Brasil desde a década de 50 (AGOSTINHO; JÚLIO JÚNIOR, 1996).

Deve-se destacar também que a posição de determinada espécie na cadeia alimentar pode influenciar na sua sensibilidade aos poluentes. Um estudo realizado por PORTO, ARAUJO e FELDBERG (2005) em rios da Amazônia contaminados com mercúrio demonstrou essa diferença, com as espécies *Prochilodus nigricans* (detritívora), *Mylossoma duriventris* (onívora) e *Hoplias malabaricus* (piscívora). A freqüência de micronúcleo na espécie piscívora foi cerca de cinco vezes maior que nas espécies detritívora e/ou onívora. Segundo estes autores, a maior freqüência de micronúcleos detectada na espécie piscívora pode ser em decorrência de três fatores: *Hoplias malabaricus*, sendo uma espécie carnívora, está em um elevado nível trófico, estando sujeito a eventos de biomagnificação; a espécie habita normalmente pequenos riachos onde os baixos valores de pH e de condutividade favorecem a produção e bioacumulação de metilmercúrio (forma mais tóxica que o metal mercúrio na sua forma inorgânica) e também o fato de a espécie apresentar um comportamento sedentário pode contribuir para que ela fique continuamente em contato com o mercúrio presente no ambiente.

Dessa forma, tornam-se necessários mais estudos visando à verificação de quais espécies podem ser usadas nas análises de biomonitoramento. Algumas como

Phoxinus phoxinus e *Genyonemus lineatus* apresentam falta de sensibilidade a diversos poluentes, como destacaram RODRIGUEZ-CEA; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2003.

Algumas das conseqüências destes tóxicos em organismos aquáticos incluem defeitos de hereditariedade devido a mutações e efeitos teratogênicos em células germinativas; declínio populacional; efeitos carcinogênicos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998); redução de crescimento; desenvolvimento anormal e redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos (LEE; STEINERT, 2003). Em humanos são citados, além da toxicidade que pode originar câncer, doenças como aterosclerose, doenças cardiovasculares e velhice prematura (GROVER; KAUR, 1999).

Devido às implicações ecológicas associadas com genotoxicidade, a detecção e a quantificação de danos genéticos são de interesse em estudos ambientais. Compostos genotóxicos produzem adutos de DNA (presença de substâncias ligantes ao DNA) ou quebras na fita de DNA, modificações químicas e físicas, respectivamente (NACCI; CAYULA; JACKIM, 1996).

A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

O impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula pode ser investigado em muitos organismos sob diferentes condições (McCARTHY; SHUGART, 1990). Químicos genotóxicos, em razão da sua alta reatividade, podem contribuir tanto no processo de carcinogênese como em outras respostas tóxicas, incluindo defeitos hereditários através de mutações na linhagem germinativa e efeitos teratogênicos. Interferências na reprodução apresentam maior impacto em nível populacional do que efeitos carcinógenos nos organismos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

1.1 Bioensaios e Biomonitoramento

Para melhor se entender sobre a ação tóxica de contaminantes, pode-se trabalhar com experimentos laboratoriais, chamados bioensaios, ou através de estudos no campo, os biomonitoramentos. Os experimentos laboratoriais são utilizados para a obtenção de dados e padronização de metodologias e permitem prever e/ou avaliar efeitos de um dado xenobionte, em determinada concentração ou dosagem, em determinada espécie. Em contrapartida, estudos no campo possibilitam o acompanhamento dos efeitos obtidos diretamente do local que está sendo analisado. Apesar de serem gerados dados complementares, deve-se atentar para o fato de que nem sempre os dados gerados sob condições experimentais podem ser intimamente relacionados com o ambiente natural.

O biomonitoramento permite observar a real situação do ambiente e dos organismos impactados, assim como as relações dos xenobiontes entre si e os fatores físicos aos quais os organismos estão sujeitos. Apesar do grande número de variáveis encontradas no ambiente dificultar a interpretação e o conhecimento isolado dos efeitos causados pelos contaminantes, o monitoramento realizado em campo permite uma avaliação mais ampla das condições naturais às quais os organismos estão sujeitos.

A avaliação das espécies expostas aos genotóxicos no ambiente aquático é complexa. Os múltiplos químicos que apresentam potencial carcinogênico normalmente se apresentam sob misturas complexas. Além disso, variações sazonais também podem influenciar as condições ambientais, a dieta e os níveis hormonais e atualmente já se tem conhecimento de que esses fatores têm influência nos sistemas enzimáticos que ativam e detoxificam os genotóxicos (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000).

Uma considerável variação inter-individual em resposta a uma injúria ambiental foi verificada no ensaio cometa por LEE e STEINERT (2003). Essa variabilidade pode interferir na avaliação de genotoxicidade, indicando a necessidade de um elevado número de indivíduos na amostra, para promover uma melhor avaliação de risco ambiental (LEMOS et al., 2005).

O uso de bioensaios permite estudar os efeitos tóxicos de determinados contaminantes de forma isolada ou associados, minimizando a influência de diferentes

variáveis ambientais. Os resultados obtidos através de bioensaios não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, mas podem cooperar no fornecimento de uma base de dados que venha a ajudar a entender os fatores que estão interferindo na saúde dos organismos e/ou alterando as condições do próprio ambiente.

Dessa forma, tanto estudos de campo como a utilização de bioensaios contribuem com importantes informações para os estudos em toxicologia ambiental, sendo ferramentas interessantes nos diagnósticos de áreas impactadas.

1.1.1 Biomonitoramento

Existem três principais situações que indicam a necessidade de um biomonitoramento: (i) quando há razões para se acreditar que espécies nativas se encontram ameaçadas; (ii) quando existem implicações para a saúde humana quanto ao consumo de organismos potencialmente afetados e (iii) quando há o interesse em se conhecer a qualidade ambiental de um determinado local (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

O monitoramento da presença de xenobióticos em ambientes aquáticos pode, a partir de estudos com espécies residentes, beneficiar a qualidade do ambiente, juntamente com a saúde humana. A localização e a determinação da concentração dos poluentes podem assegurar a vida destas espécies e também um ambiente saudável, garantindo ao homem sua utilização para alimentação, abastecimento e lazer (NICARETA, 2004).

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

Vários trabalhos têm sido realizados nos últimos anos, utilizando diversos biomarcadores, visando determinar a qualidade ambiental de diferentes localidades. HOSE et al. (1987) verificaram elevada frequência de micronúcleos em peixes de locais contaminados na Califórnia; também avaliando a frequência de micronúcleos, podemos citar DE FLORA et al. (1993) que trabalharam nos rios Lambro e Po, na Itália;

PANDRANGI et al. (1995) que realizaram o ensaio cometa para avaliar animais coletados em sete diferentes localidades na Região dos Grandes Lagos, no Canadá; MINISSI, CICCOTTI e RIZZONI (1996) nos rios Tiber e Mignone. Na China, também podemos citar o trabalho de ZENG, LI e LIN (1999), que, ao empregarem o teste do micronúcleo em *Tradescantia*, verificaram a adequação deste teste, inclusive, para determinação de diferentes níveis de poluição em águas de três rios. Na Escócia, BOMBAIL, GORDON e BATTY (2001) avaliaram a frequência de micronúcleos e as quebras no DNA pelo ensaio cometa de *Pholis gunnellus*; na França FLAMMARION et al. (2002), trabalhando com quantificação de atividade enzimática e quebras no DNA detectadas pelo ensaio cometa em *Leuciscus cephalus* em cinco localidades no Rio Moselle; WINTER et al. (2004) coletando essa mesma espécie em rios da Inglaterra, avaliaram quebras e adutos no DNA e RUSSO et al. (2004) nos rios Sarno e Astroni, também trabalhando com o ensaio cometa.

No Brasil, poucos trabalhos estão sendo realizados, porém esse número vem aumentando nos últimos anos. Destacam-se, nesse sentido, os trabalhos de AMADO et al. (2006a) que utilizaram biomarcadores genéticos e imunológicos para determinação da contaminação de áreas na Lagoa dos Patos (RS); ANDRADE, FREITAS e SILVA (2004) que, trabalhando com tainhas (*Mugil sp*) e bagres (*Netuma sp*), verificaram a toxicidade no lago Armazém, Rio Grande do Sul e LEMOS et al. (2005), analisando quebras no DNA de tilápias (*T. rendalli*) coletadas no Lago Igapó II em Londrina, no Paraná. A Tabela 01 apresenta alguns trabalhos de biomonitoramento publicados, com ênfase nos biomarcadores genéticos, indicando as espécies utilizadas e as localidades monitoradas.

TABELA 01 – RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS NA ÁREA DE BIOMONITORAMENTO, DANDO ÊNFASE AOS ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

continua

LOCAL	PAÍS	ENSAIOS E ESPÉCIES	REFERÊNCIA
Lago Igapó – Londrina	Brasil	Ensaio cometa em eritrócitos de <i>Tilapia rendalli</i>	LEMOS et al. (2005)
Rios Po e Lambro	Espanha	Micronúcleo, mutagenicidade na bile, indução enzimática e metabolismo no fígado de <i>Oncorhynchus mykiss</i>	De FLORA et al. (1993)
Ecosistemas de água doce	Espanha	Micronúcleos e assimetria flutuante em <i>Salmo trutta</i>	SANCHEZ-GALAN et al. (1998)
Lagoa dos Patos	Brasil	Ensaio cometa, micronúcleo, atividade enzimática e peroxidação lipídica em <i>Micropogonias furnieri</i>	AMADO et al. (2006a)
Rios River e Astroni	Itália	Ensaio cometa e teste do micronúcleo em <i>Gambusia holbrooki</i>	RUSSO et al. (2004)
Escócia	Reino Unido	Ensaio cometa e teste do micronúcleo em <i>Pholis gunnellus</i>	BOMBAIL, GORDON e BATTY (2001)
Rio Rhone	França	Ensaio cometa e citocromo P450 1A em <i>Leuciscus cephalus</i>	DEVAUX et al. (1998)
Rio Tomio	Japão	Micronúcleo e aberrações cromossômicas em <i>Carassius sp</i> e <i>Zacco platypus</i>	HAYASHI et al. (1998)
Rios Antai, Baima e Jinan	Rep. Pop. da China	Micronúcleo em <i>Tradescantia</i>	ZENG, LIN e LI (1999)
Rio Moselle	França	Indução citocromo P450, atividade enzimática e ensaio cometa em <i>Leuciscus cephalus</i>	FLAMMARION et al. (2002)
Birmingham	Reino Unido	Ensaio cometa e adutos de DNA em <i>Leuciscus cephalus</i>	WINTER et al. (2004)
Amazônia	Brasil	Teste do micronúcleo em <i>Prochilodus nigricans</i> , <i>Mylossoma duriventris</i> e <i>Hoplias malabaricus</i>	PORTO, ARAUJO e FELDBERG (2005)
Diversas localidades	Espanha	Micronúcleos em <i>Salmo trutta</i> , <i>Phoxinus phoxinus</i> e <i>Anguilla anguilla</i>	RODRIGUEZ-CEA, AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2003)
Rios Mignone e Tiber	Itália	Teste de micronúcleo em <i>Barbus plebejus</i>	MINISSI, CICCOTTI e RIZZONI (1996)

TABELA 01 – RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS NA ÁREA DE BIOMONITORAMENTO, DANDO ÊNFASE AOS ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

LOCAL	PAÍS	ENSAIOS E ESPÉCIES	REFERÊNCIA	conclusão
Califórnia	EUA	Diversidade genética em <i>Mytilus galloprovincialis</i> e <i>Balanus glandula</i>	MA, COWLES e CARTER (2000)	
Nevada	EUA	Micronúcleo, citometria de fluxo e diversidade genética em <i>Dipodomis merriami</i>	THEODORAKIS, BICKHAM e LAMB (2001)	
Piraquê, Itamaracá e Baía de Paranaguá	Brasil	Estresse oxidativo e atividade enzimática em <i>Crassostrea rhizophorae</i>	ZANETTE, MONSERRAT e BIANCHINI (2006)	
Lagoa dos Patos	Brasil	Micronúcleo, ensaio cometa e estresse oxidativo em <i>Paralichthys orbignyanus</i>	AMADO et al. (2006b)	
Canal Inglês	França	Adutos de DNA no fígado e avaliação de quebras no sangue pelo ensaio cometa em <i>Limanda limanda</i>	AKCHA, HUBERT e PFHOL-LESZKOWICZ (2003)	

1.1.2. Bioensaios

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse sobre a genotoxicidade em águas e sedimentos sendo que estes 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; CICCOTINI; RIZZONI, 1996).

Os métodos de exposição de peixes aos agentes genotóxicos são geralmente por imersão (quando os poluentes se encontram dissolvidos na água), através de injeção intraperitoneal com o químico que está tendo sua genotoxicidade avaliada ou por via trófica, na qual os animais pesquisados são alimentados com algum contaminante. AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2001) analisaram a frequência de micronúcleos e alterações nucleares na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) decorrentes de injeção intraperitoneal de seis compostos genotóxicos diferentes: ciclofosfamida, N-etil-N-nitrosuéra, mitomicina, colchicina, acrilamida e metilmetanosulfonato e alguns importantes experimentos com exposições por imersão têm sido descritos para diferentes espécies, por exemplo, *Cyprinus carpio* ao mercúrio (NEPOMUCENO et al., 1997), *Carassius auratus gibelio* ao cromo (AL-SABTI et al., 1994), *Rhodeus ocellatus* ao tricloroetileno (HAYASHI et al., 1998), *Cheirodon interruptus* a piretróides (CAMPANA et al., 1999) e *Salmo trutta*, *Anguilla anguilla* e *Phoxinus phoxinus* aos mutagênicos ciclofosfamida, colchicina e cádmio (RODRIGUEZ-CEA, AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2003).

TABELA 02 – RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS COM BIOENSAIOS, COM ÊNFASE AOS TESTES DE GENOTOXICIDADE USANDO DIFERENTES ORGANISMOS-TESTE

continua

AGENTES GENOTÓXICOS	EXPOSIÇÃO	ENSAIOS, TECIDOS E ESPÉCIES	REFERÊNCIA
ENU (etilnitrosouria) e p-dimetilamino- benzeno (DAB)	3 e 24 h	Cometa de fígado, pulmão, baço, rim, e medula óssea de camundongos	SASAKI et al. (1997b)
EMS (etilmetanossulfonato)	3 e 7 dias	Cometa de sangue, fígado, brânquias e rim de <i>Psetta maximus</i>	BELPAEME, COOREMAN E KIRSCH-VOLDERS (1998)
MMS (metilmetanossulfonato) e DEN (dietilnitrosanima)	3 e 24 h	Cometa de fígado, rim, pulmão, baço e medula óssea de ratos	MIYAMAE et al. (1998)
Ciclofosfamida		Ensaio cometa de tecidos e eritrócitos de <i>Ameiurus nebulosus</i> e <i>Cyprinus carpio</i>	PANDRANGI et al. (1995)
MMS	8 h	Ensaio cometa em células de fígado e brânquias de <i>Brachydanio rerio</i>	DEVENTER (1996)
Mitomicina C, Ciclofosfamida, 5-fluoroucil e bleomicina	2,7,14 e 30 dias	Micronúcleo de <i>Tilapia rendalli</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>Cyprinus carpio</i>	GRISOLIA E CORDEIRO (2000)
Mitomicina C e radiação Y	0 a 60 dias	Micronúcleos de <i>Clarias gariepinus</i>	BAHARI, NOOR E DAUD (1994)
Colchicina, ciclofosfamida, mitomicina C, cádmio e mercúrio	24 h	Micronúcleos em <i>Phoxinus phoxinus</i> e <i>Poecilia latipinna</i>	AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2000)
Pentaclorofenol e 2,4-ácido diclorofenoxiacético	48, 72 e 96h	Micronúcleos em <i>Channa punctatus</i>	FARAH et al. (2003)
Mitomicina C e efluente de fábrica de papel		Micronúcleos em sangue de <i>Heteropneustes fossilis</i>	DAS E NANDA (1986)
Cloreto de cádmio e raios X		Micronúcleos de brânquia e fígado de <i>Oreochromis mossambicus</i>	MANNA e SADHUKHAN (1986)
EMS (etil metano sulfonato)		Micronúcleos em eritrócitos de <i>Umbra pygmaea</i>	HOOFMAM e de RAAT (1982)
TBT e chumbo inorgânico	2 meses	Ensaio cometa em sangue, micronúcleos e aberrações cromossômicas em <i>Hoplias malabaricus</i>	FERRARO et al. (2004)

TABELA 02 – RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS COM BIOENSAIOS, COM ÊNFASE AOS TESTES DE GENOTOXICIDADE USANDO DIFERENTES ORGANISMOS-TESTE

AGENTES GENOTÓXICOS	EXPOSIÇÃO	ENSAIOS, TECIDOS E ESPÉCIES	REFERÊNCIA	conclusão
Cobre, cádmio e cloro	2-5 dias	Biomarcador nucleolar e micronúcleos em células da cauda de <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Carassius auratus gibelio</i> e <i>Tilapia (Sautherodon) mossambica</i>	ARKHIPCHUK e GARANKO (2005)	
Selênio, mercúrio e metilmercúrio	10 h	Células binucleadas de <i>Carassius auratus gibelio</i>	AL-SABTI et al. (1994)	
Colchicina, mitomicina C, ciclofosfamida, MMS e acrilamida	24 h	Micronúcleos e alterações nucleares de <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2000)	
Cádmio e mercúrio	24 h	Micronúcleos em <i>Anguilla anguilla</i>	SANCHEZ-GALAN et al. (2001)	
Endossulfano	24, 48, 72 e 96 h	Ensaio cometa em <i>Channa punctatus</i>	PANDEY et al. (2006)	
Cobre	24, 48 e 72 h	Ensaio cometa de leucócitos de camundongos	BANU et al. (2004)	
Cobre	6, 24 e 48 h	Aberrações cromossômicas e micronúcleos em <i>Gallus domesticus</i>	BHUNYA e JENA (1996)	
Cromo, cádmio e cobre	21 dias	Micronúcleos e células binucleadas e sangue, brânquias e fígado de <i>Cyprinus carpio</i>	CAVAS, GARANKO e ARKHIPCHUK (2005)	
TBT	19 e 37 dias	Aberrações cromossômicas em <i>Astyanax sp.</i>	CIPRIANO et al. (2004)	
Chumbo	18, 41 e 64 dias	Ensaio cometa de sangue e aberrações cromossômicas em <i>Hoplias malabaricus</i>	CESTARI et al. (2004)	
Peróxido de hidrogênio	30 min	Ensaio cometa de <i>Pholis gunnellus</i>	BOMBAIL, GORDON e BATTY (2001)	
MMS	1,2,6 e 24 h	Ensaio cometa em <i>Mugil sp</i> e <i>Netuma sp</i>	ANDRADE, FREITAS e SILVA (2004)	
Ciclofosfamida, colchicina e cloreto de cádmio		Micronúcleos em <i>Salmo trutta</i> , <i>Phoxinus phoxinus</i> e <i>Anguilla anguilla</i>	RODRIGUEZ-CEA, AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2003)	
MMS, benzoapireno, ciclofosfamida e mitomicina	16 h	Cometa e micronúcleo em ratos	VRZOC, PETRAS (1997)	
Peróxido de hidrogênio	120 min	Cometa em hepatócitos de <i>Onchorynchus mykiss</i>	DEVAUX, PESONEN e MONOD (1997)	
Benzoapireno	12 dias	Ensaio cometa e micronúcleo em <i>Perna viridis</i>	SIU et al. (2004)	
Cobre	48 h	Alterações morfológicas e histológicas em <i>L. acuta</i>	GERACITANO et al. (2004)	

1.2 Testes para o monitoramento de Genotoxicidade Ambiental

Por volta dos anos 50 e 60 a ecologia e a genética se uniram e, a partir daí, foram desenvolvidos os primeiros testes rápidos e eficientes que são empregados em estudos de genotoxicidade (VILLELA et al., 2003). Dentre os principais testes, podemos citar os de avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, formação de adutos de DNA, ensaio cometa (que avalia quebras no DNA) e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001).

1.2.1 Teste do Micronúcleo Písceo

Ainda que nossos conhecimentos da estrutura dos cromossomos sejam incompletos, evidências sugerem que anormalidades cromossômicas sejam uma consequência direta e uma manifestação do dano ao nível de DNA, por exemplo, quebras cromossômicas podem resultar do não pareamento das fitas de DNA e rearranjos cromossômicos podem resultar de mal pareamento na fita de DNA (SAVAGE, 1993). É também sabido que a perda de cromossomos e a mal-segregação (não disjunção) são importantes eventos no câncer e no envelhecimento e que são provavelmente causados por defeitos no fuso, centrômero ou uma consequência da baixa condensação da estrutura cromossômica antes da metáfase (EVANS, 1990).

Nas técnicas de citogenética clássica, cromossomos são estudados diretamente, sendo feita a observação e a contagem de aberrações nas metáfases. Apesar de essas técnicas fornecerem uma análise bastante detalhada, a complexidade e o trabalho laboratorial em classificar essas aberrações e os problemas de artefatos ocasionados pela preparação das metáfases têm estimulado o desenvolvimento de sistemas mais simples de medir danos cromossômicos (FENECH, 2000).

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 laboratórios. Esse teste é um método citogenético amplamente utilizado, sendo aplicado em pesquisas com populações de células em proliferação, especialmente células eritropoiéticas de roedores, para avaliar dano cromossômico *in vivo* (HAYASHI et al., 1998).

A análise de micronúcleos foi proposta independentemente por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975) como uma alternativa simples para se avaliar danos cromossômicos *in vivo* com populações de células em divisão, tal como as da medula óssea. O ensaio do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico é agora um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica, entretanto, não é uma técnica que é aplicada para outras populações de células *in vivo* e *in vitro* (FENECH, 2000). É evidente que micronúcleos podem somente ser expressos em células eucarióticas em divisão, ou seja, o ensaio não pode ser usado eficientemente ou quantitativamente em populações de células que não estejam em divisão ou em populações de células em divisão nas quais a cinética da divisão celular não seja bem conhecida ou controlada (FENECH, 2000).

O ensaio de micronúcleo em ratos é amplamente usado devido a sua simplicidade e ampla base de dados, mas é aplicável primariamente em células do sistema hematopoiético. Porém, como alguns carcinógenos não têm como alvo o sistema hematopoiético e não induzem resposta positiva no teste do micronúcleo em ratos, ensaios *in vivo* devem ser aplicados usando um número maior de órgãos (MIYAMAE et al., 1998).

O Teste do Micronúcleo Píscico é bastante utilizado em análises ambientais tendo em vista que estudos de genotoxicidade usando análises citogenéticas em peixes demonstram a sensibilidade destes organismos (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Como o teste do micronúcleo é capaz de detectar tanto efeitos aneugênicos como clastogênicos, a genotoxicidade de uma grande variedade de compostos pode ser testada através dessa técnica (HEDDLE et al., 1991).

Uma das vantagens é que pode ser aplicado em qualquer população de células em proliferação sem depender do cariótipo envolvido. Devido aos peixes terem um grande número de cromossomos, e muitas vezes de pequeno tamanho, as análises das metáfases para avaliação de aberrações cromossômicas são dificultadas, enquanto que o estudo de micronúcleos é fácil e possível de ser realizada em eritrócitos, devido ao fato destes serem nucleados (HAYASHI et al., 1998).

O teste do micronúcleo píceo vem sendo usado para estimar o nível de exposição a contaminantes em muitas pesquisas desde os anos 80. Esse teste, medindo dano cromossômico estrutural ou numérico, tem sido usado para avaliar genotoxicidade, sendo, dessa forma, um indicador recomendado para estudos ambientais, tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). O consenso geral é que a contagem de micronúcleos durante a intérfase é tecnicamente fácil e mais rápida quando comparada à contagem de aberrações cromossômicas durante a metáfase (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

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. A avaliação da frequência de anomalias nucleares e de micronúcleos são ensaios muito utilizados, já há algum tempo, para investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em peixes (AL-SABTI, 1986). Exposição de peixes a conhecidos agentes mutagênicos como benzopireno e mitomicina C induzem formação de micronúcleos. Do mesmo modo, podem ocorrer anomalias celulares associadas, 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; GORDON; BATTY, 2001).

Em peixes, diversos tipos de lesões nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. CARRASCO, TYLBURY e MYERS (1990) descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes. Essas lesões foram basicamente classificadas em:

a) *Blebbed*: 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.

Essas anormalidades têm sido utilizadas por alguns autores como um indicativo do dano citogenético em espécies de peixes, porém, CARRASCO, TYLBURY e MYERS (1990), que descreveram essas alterações, não observaram uma associação significativa entre variações na morfologia do núcleo (incluindo micronúcleos) e os níveis de poluição química em sedimentos ou em tecidos de peixes, indicando uma fragilidade do uso do teste do micronúcleo em peixes. Sua possível falta de sensibilidade é devido à baixa e também variável frequência de micronúcleos em peixes silvestres.

AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2001) sugerem que as anomalias nucleares devem ser incluídas nas análises de genotoxicidade em peixes baseadas na contagem de micronúcleo, por apresentar resultados mais confiáveis e mais completos. Segundo este trabalho, a espécie *Oncorhynchus mykiss*

apresentou resultados diferentes frente aos diversos compostos testados em situações de bioensaio. Segundo eles, a ciclofosfamida induziu aumento na frequência de micronúcleos e de alterações morfológicas, a mitomicina induziu somente aumento na frequência de alterações nucleares, o metilmetanossulfonato não induziu mudanças nas frequências de alterações e nem de micronúcleos e os compostos N-etil-N-nitrosurea, acrilamida e colchicina ocasionaram aumento na frequência de micronúcleos, mas não de alterações morfológicas nucleares.

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

AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2000), trabalhando com as espécies *Phoxinus phoxinus* e *Poecilia latipinna*, verificaram que agentes reconhecidamente genotóxicos, com forte ação clastogênica tanto *in vivo* como *in vitro*, podem agir de maneiras diferentes. Enquanto a colchicina e a mitomicina C induziram aumento na frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares, a ciclofosfamida induziu apenas aumento de anormalidades, não levando à formação de micronúcleos. Esses resultados sugerem que alguns compostos podem agir formando anormalidades nucleares, porém sem a formação de micronúcleos. Dessa forma, torna-se evidente que mais estudos são necessários para se conhecer melhor o mecanismo de formação das anormalidades nucleares, para que possa ser determinada mais precisamente a origem genotóxica dos contaminantes.

Da mesma forma, GRISOLIA e CORDEIRO (2000) testaram diferenças de respostas entre três espécies de peixes (*Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*) a quatro compostos clastogênicos: bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracil e mitomicina C e verificaram que, em geral, a ciclofosfamida apresentou maior potencial clastogênico que os demais compostos; a espécie *T. rendalli* foi a mais sensível e *C. carpio* a mais resistente.

HEDDLE et al. (1991) destacam que micronúcleos são respostas a curto prazo a uma substância genotóxica, de modo que a sua expressão depende da intensidade da exposição à poluição e provavelmente independe da duração de tal exposição. MINISSI, CICCOTTI e RIZZONI (1996) também concluíram que o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes é indicativo de dano citogenético de curto prazo, uma vez que conseguiram demonstrar a capacidade de recuperação em organismos que foram removidos do ambiente natural e mantidos em condições laboratoriais controladas.

Segundo AL-SABTI e METCALFE (1995) a máxima indução de micronúcleos normalmente ocorre de um a cinco dias de exposição, concordando com os resultados de GRISOLIA e CORDEIRO (2000), que observaram a maior indução de micronúcleos ocorreu entre dois e sete dias pós-tratamento. Segundo os resultados observados por GRISOLIA e CORDEIRO (2000) foi observada tendência à diminuição da frequência de micronúcleos a partir do décimo quarto dia de exposição.

A frequência 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; METCALFE, 1995).

Nem todos os agentes que induzem micronúcleos são clastogênicos, micronúcleos podem ser formados por uma não disjunção como 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 não são totalmente conhecidos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Ensaio de micronúcleos em peixes são geralmente realizados com eritrócitos do sangue periférico devido à facilidade do seu uso. Além de eritrócitos, outros tipos de células, como de brânquias e de fígado, também foram usados por diversos autores como uma alternativa (MANNA; SADHUKHAN, 1986). Como o

fígado é o centro do metabolismo de xenobióticos, ele pode ser considerado como um tecido adequado para o teste do micronúcleo, entretanto, o seu uso apresenta limitação devido ao seu baixo índice mitótico. De modo contrário, células de brânquias apresentam vantagens sobre os eritrócitos, pois se encontram em contínua divisão e diretamente expostas aos contaminantes (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Segundo HAYASHI et al. (1998), o ensaio do micronúcleo realizado com células de brânquias mostrou-se mais sensível que os eritrócitos, concordando com CAVAS, GARANKO e ARKHIPCHUK (2005) que também relatam sensibilidade maior de células de brânquias e de fígado frente às do sistema eritrocitário.

O teste do micronúcleo píceo tem sido usado também como indicador biológico *in situ* em peixes no seu ambiente selvagem por diversos autores, como HOSE et al., 1987; CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990; MINISSI; CICCOTTI; RIZZONI, 1996; SANCHEZ-GALAN et al., 2001; RODRIGUEZ-CEA, AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2003. Entretanto, no Brasil ainda são poucos os relatos do uso do teste do micronúcleo para avaliar efeitos dos contaminantes em peixes (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000). PORTO, ARAUJO e FELDBERG (2005) verificaram o efeito da poluição por mercúrio através do teste do micronúcleo píceo em diferentes espécies de peixes. Eles observaram diferenças ao compararem animais do Rio Solimões e do Rio Madeira, sendo o Rio Solimões tido como referência por estar afastado da região da mineração e sem recebimento de resíduos municipais e o Rio Madeira, próximo às áreas de mineração, apresentando animais com maior número de micronúcleos e de alterações nucleares.

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 a perda de cromossomos na anáfase, bem como também não é 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-se subestimativo e com baixa sensibilidade (METCALFE, 1989).

1.2.2 Ensaio Cometa

Nos últimos anos, tem crescido o interesse científico no ensaio cometa para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). O ensaio investiga danos no DNA 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; GORDON; BATTY, 2001).

O consenso geral atual é que este ensaio é simples, rápido e sensível, capaz de detectar uma quebra em 1×10^{10} Da. Também apresenta a vantagem de utilizar qualquer célula nucleada eucariótica, inclusive células vegetais (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). Contudo, uma das maiores críticas da técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

As quebras no material genético podem ocorrer através de um grande número de mecanismos como radiação ionizante nos locais álcali-lábeis, entre outros. Dessa forma, é importante reconhecer que as quebras podem ocorrer por vias não relacionadas diretamente com a genotoxicidade de um químico. A ativação de enzimas como as endonucleases e as topoisomerasas podem resultar em um elevado número de quebras bem como elevados níveis de compostos reativos endógenos, como radicais super-óxidos e óxido nítrico. Assim, quebras podem refletir efeitos diretos de substâncias xenobióticas bem como variações nos níveis de compostos celulares normais. Entretanto, a natureza não específica desse ensaio em se determinar quebras no DNA causadas por agentes químicos é compensada pela alta sensibilidade e aplicabilidade a diversos tipos de células, o que o torna um teste ideal para monitoramento ambiental, segundo MITCHELMORE e CHIPMAN (1998).

Outra limitação relacionada com a detecção das quebras diz respeito à ação dos mecanismos de reparo que possam agir antes das análises das quebras. Comparado às células de mamíferos, entretanto, o reparo do DNA em organismos aquáticos é mais lento (ESPINA; WEISS, 1995), o que pode ser vantajoso nas análises de quebras induzidas diretamente, mas que podem diminuir a sensibilidade do ensaio. Também não pode ser esquecido que o tipo de dano observado pelo ensaio é possivelmente reversível, o que já foi observado por vários autores em estudos de monitoramento ambiental, como NACCI et al. (1992) e PANDRANGI et al. (1995). Os resultados obtidos por esses autores demonstram que animais contaminados apresentam grande número de quebras no DNA ao serem coletados e menos quebras após um período de recuperação em condições não poluídas, em laboratório, refletindo a reversibilidade e não persistência de tal dano. Da mesma forma, LEMOS et al. (2005) verificaram diminuição no índice de quebras em *T. rendalli* mantidos em laboratório por dois meses.

Um outro ponto que também deve ser considerado na análise diz respeito à detecção das quebras que podem ocorrer como resultado da digestão de DNA durante o processo de apoptose, segundo observaram MITCHELMORE e CHIPMAN (1998).

O ensaio cometa tem sido utilizado como uma ferramenta interessante para monitoramentos, na demonstração da genotoxicidade de substâncias e para investigar impactos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental. Nesse sentido, três principais vantagens foram identificadas: (i) qualquer tipo de tecido com células nucleadas pode ser usado, (ii) são necessárias pequenas quantidades de amostras e (iii) o ensaio é rápido, sensível e barato (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

O princípio desta técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não apresentar dano migrará de forma homogênea formando um círculo. Caso o DNA pesquisado apresente 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; BANÁTH; DURAND, 1990).

Ao contrário de outros tipos de ensaio como os testes de micronúcleo, 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 (PANDRANGI 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. PANDRANGI et al. (1995) demonstraram, utilizando o ensaio cometa, aumento no dano no DNA em eritrócitos de *Ameiurus nebulosus* e de *Cyprinus carpio* depois da exposição à ciclofosfamida; DEVAUX, PESONEN e MONOD (1997) também mostraram o aumento no comprimento da cauda do nucleóide após a exposição de hepatócitos de *Onchorynchus mykiss* ao benzopireno e ao peróxido de hidrogênio. Deve-se destacar, entretanto, que a resposta depende das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula, do mutagênico e da duração da exposição (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Segundo BELPAEME; COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS (1998), apesar das inúmeras vantagens do ensaio, algumas desvantagens importantes permanecem, como a inabilidade de detectar dano genético assim como mutação gênica; lesões produzidas no DNA não são estáveis e podem ser reparadas, assim como a estimativa a longo prazo dos efeitos em organismos é difícil; elevadas variabilidades inter e intra individuais podem impedir a clara interpretação dos resultados e a quantificação do número de quebras não é possível.

Basicamente, o ensaio consiste das etapas de preparação da suspensão celular, incubação em uma solução de lise, etapa de desespiralização do DNA e uma corrida eletroforética. 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 que proporcionam 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) estas 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 menor do que os detectados por outros métodos existentes (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

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; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998), porém com cada vez maior aceitação por parte da comunidade científica.

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 (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 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; CHIPMAN, 1998).

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

De acordo com HINTON e LAUREN (1990) existem muitas razões para selecionar o fígado como um importante órgão em estudos de toxicologia. O fígado dos teleósteos é o tecido que apresenta maior atividade de EROD e citocromo P450 1A1, importantes na inativação de hidrocarbonetos de petróleo, na estocagem de nutrientes, na reação de catabolismo de produtos oriundos de outros tecidos e também na produção da bile, com o duplo papel de favorecer a digestão de ácidos graxos e carregar metabólitos tóxicos para a excreção.

Ensaio realizados com o mutagênico EMS (etilmetanossulfonato) mostraram resultados estatisticamente significantes para diferentes tecidos com o ensaio cometa, mostrando 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 com as seguintes ressalvas ou distinções: 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; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Como o ensaio cometa analisa as células individualmente, há uma certa limitação na desagregação do tecido. O ensaio cometa apresenta o potencial de ser usado em uma grande variedade de órgãos, porém uma metodologia de dissociação celular não se encontra padronizada. As células devem ser separadas por processos de fragmentação (processos mecânicos) ou através da aplicação de enzimas. Porém, o uso do ensaio cometa para o propósito de biomonitoramento requer técnicas de dissociação rápidas, simples e baratas, tendo em vista que muitas amostras precisam ser processadas em avaliações de contaminação ambiental (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). As 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 utilizado, todo o processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos adicionais ao DNA possam ocorrer (FERRARO, 2003).

BELPAEME, COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS (1998) analisaram diferentes métodos para o isolamento de células de fígado, brânquias e rim de peixes, e verificaram que a técnica de desagregação com homogeneizador de tecidos foi a que forneceu melhores resultados, além de apresentar vantagens como simplicidade, rapidez e baixo custo para sua realização. SASAKI et al. (1997b), também verificaram a aplicabilidade da desagregação mecânica em homogeneizador de tecidos tendo ainda observado que a dissociação pelo método enzimático provocou danos adicionais ao DNA.

MIYAMAE et al. (1998) constataram a viabilidade dos núcleos de células isoladas a partir das técnicas da homogeneização de rim, fígado, pulmão, baço e medula óssea em ratos. Esses autores, ao trabalharem com os agentes MMS (metilmetanossulfonato) e o DEN (dietilnitrosamina), verificaram que estes agem de maneira diferente nos diferentes tecidos; enquanto o MMS agiu em todos os órgãos, o DEN induziu dano genético somente no fígado, rim e pulmão. Essas diferenças podem refletir diferentes mecanismos de danos ao DNA. Enquanto o MMS reage diretamente com DNA, o DEN reage secundariamente via seus metabólitos intermediários. Outro fato importante observado nesse trabalho foi que os danos genéticos diminuíram 24 horas após o tratamento com MMS em todos os órgãos, provavelmente em decorrência do reparo e/ou morte das células danificadas, o que não foi observado no tratamento com DEN. Essas diferenças podem, dessa forma, influenciar sobre o potencial carcinogênico de cada um destes químicos.

SASAKI et al. (1997b), trabalhando com fígado, pulmão, baço, rim e medula óssea de ratos, observaram ação diferenciada de compostos genotóxicos em diferentes órgãos. A genotoxicidade do ENU (etilnitrosouréia) foi observada, através do ensaio cometa, em todos os órgãos testados, enquanto que o DAB (p-dimetilaminoazobenzeno) induziu lesões somente no fígado, indicando que esse químico tem uma ação específica sobre esse órgão.

De acordo com NACCI, CAYULA e JACKIM (1996) as condições ótimas do ensaio cometa podem ser diferentes para diferentes órgãos, sendo que nestes trabalhos a especificidade para tecidos na eletroforese foi demonstrada.

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, conforme já citado, o tecido pesquisado deve ser antes adequadamente desagregado.

1.3 Caracterização das áreas de estudo

1.3.1 Fazenda Experimental Cangüiri – Universidade Federal do Paraná

Situada à Rua Ivone Pimentel, s/n, Pinhais (PR), a Fazenda Experimental Cangüiri (Figura 01) está localizada a 20 km de Curitiba. Na região, destacam-se atividades ligadas à agricultura (feijão, milho, trigo, mandioca, etc.), fruticultura (frutas de clima temperado), olericultura, bovinocultura de leite, suinocultura, ovinocultura e exploração florestal. A Fazenda do Cangüiri ocupa uma área de 220 hectares dentro da Área de Proteção Ambiental (APA) do Rio Iraí (UFPR, 2006). A APA do Iraí é uma unidade territorial criada em 1996 para proteger os mananciais da Grande Curitiba. Nessas áreas não são permitidas a implantação de loteamentos convencionais nem a utilização de agrotóxicos.

A APA do Iraí, localizada na porção nordeste da Região Metropolitana de Curitiba, possui área aproximada de 11.536 hectares e está situada entre os paralelos 25º25' e 25º15' Sul e os meridianos 49º10' e 48º50' Oeste de Greenwich. Ela abrange parte dos municípios de Colombo, Pinhais, Piraquara, Quatro Barras e Campina Grande do Sul (Figura 02) tendo sido criada em 1996 para "proteção e conservação da qualidade ambiental dos sistemas naturais ali existentes, em especial a qualidade e quantidade de água para fins de abastecimento público" conforme consta no artigo 2º do Decreto Estadual nº 1.753/96. A APA do Iraí a montante da barragem do Rio Iraí, abrange quatro rios principais: Cangüiri, Timbu, Cercado e Curralinho e tem como característica "uma grande diversidade

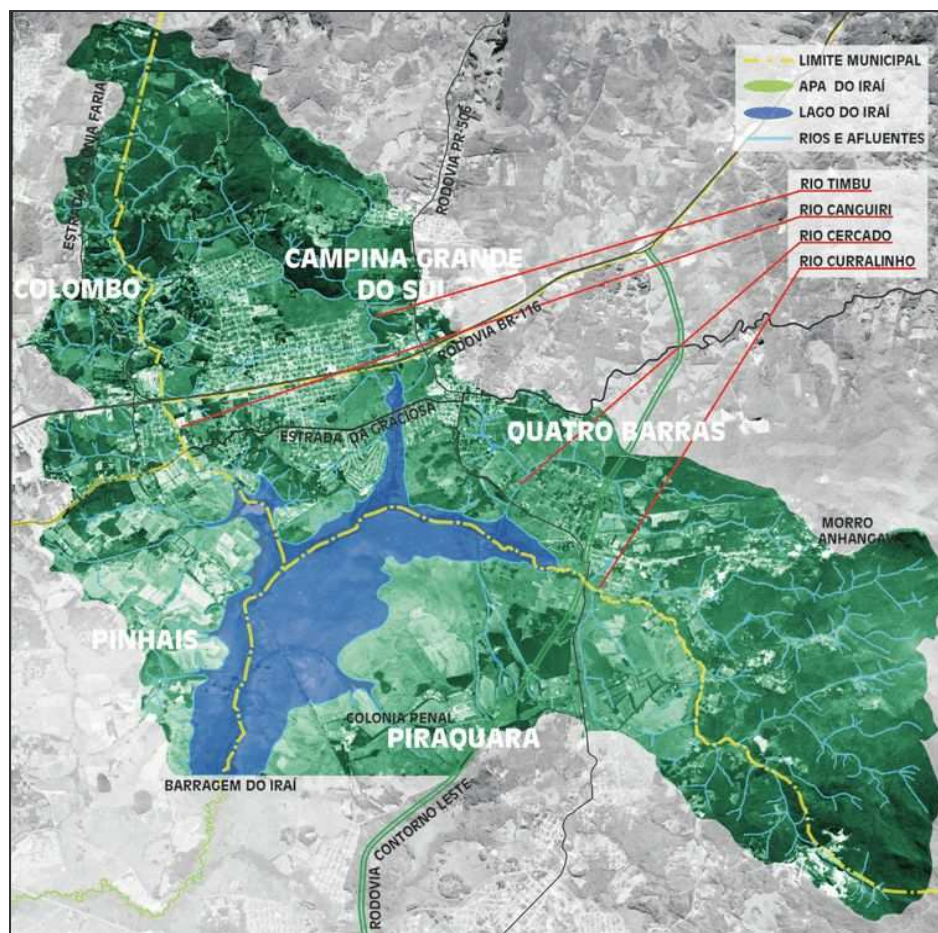
paisagística e ambiental, destacando-se a Serra do Mar e os campos de várzea pela sua biodiversidade" (RELATÓRIO FINAL DO ZONEAMENTO ECOLÓGICO ECONÔMICO, 2000).

FIGURA 01 - FAZENDA EXPERIMENTAL DO CANGUIRI – NOV/05



FONTE: A autora

FIGURA 02 – REGIÃO DE ABRANGÊNCIA DA APA DO IRAÍ



FONTE: MATER NATURA, 2006

A bacia do rio Iraí necessita de constantes medidas de proteção ao seu ambiente por contemplar cinco municípios e conter grandes áreas urbanizadas ou em processo de ocupação acelerada. Com a formação do reservatório da Barragem do Iraí, que cobre uma extensão de 14,5 km², estabeleceu-se uma nova realidade ambiental na área, gerando a necessidade de novos instrumentos de gestão ambiental para a APA do Iraí, de modo geral e, em particular, para as áreas próximas ao lago (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005).

Segundo o RELATÓRIO FINAL DO ZEE (2000), alguns pontos críticos relativos aos usos antrópicos no entorno da barragem que podem comprometer a qualidade da água são:

- Atividades industriais de risco: algumas indústrias instaladas no território da APA possuem elevado potencial poluidor que, mesmo havendo tratamento dos efluentes e medidas de proteção, oferecem risco à qualidade do manancial;

- Centro Agronômico: as atividades realizadas na Fazenda da UFPR e no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) oferecem risco ao manancial hídrico por utilizarem produtos químicos em suas pesquisas;

- Hospitais: oferecem risco de contaminação do manancial por agentes patogênicos e remédios;

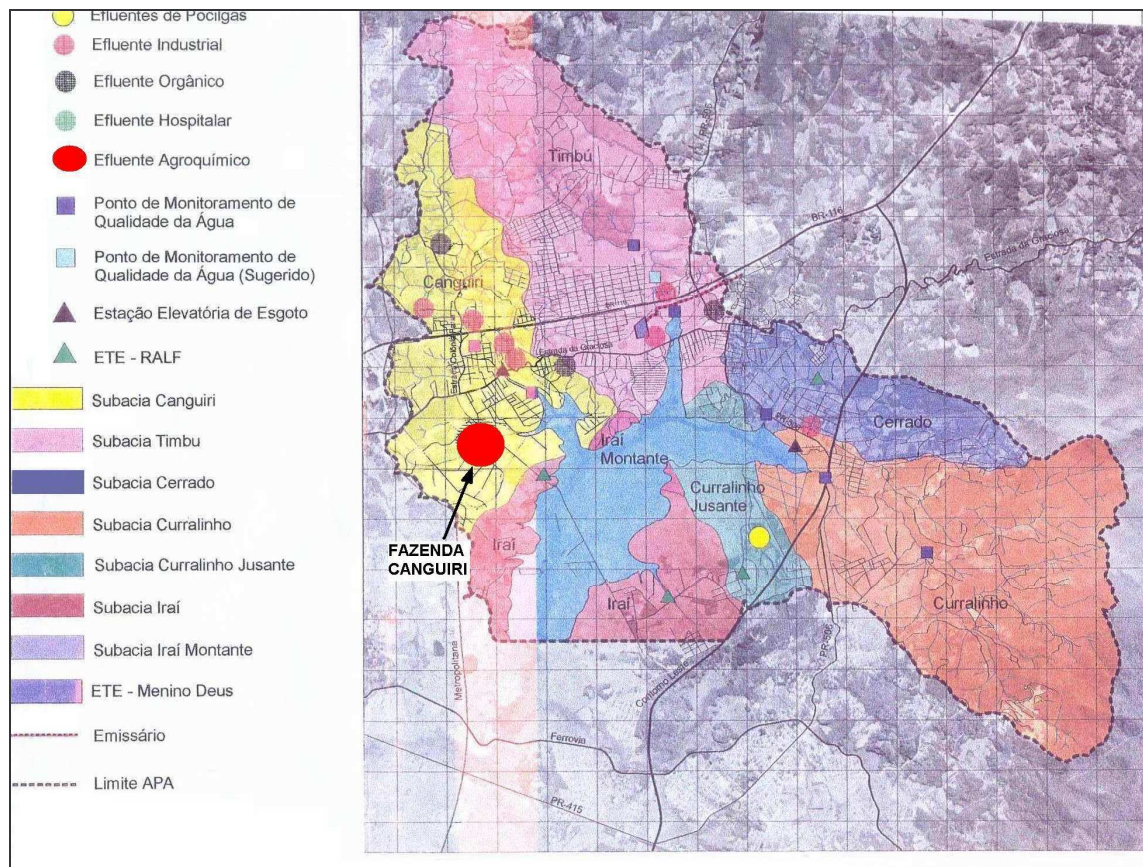
- Cemitérios: efluentes orgânicos provenientes dos cemitérios podem vir a comprometer a qualidade da água;

- Pocilgas: os efluentes líquidos e sólidos não devidamente manejados comprometem a qualidade da água, solo e subsolo.

A Figura 03 apresenta as sub-bacias da APA do Iraí com as fontes de contaminação. No mapa merece destaque a região da sub-bacia Cangüiri com a contaminação por efluente agroquímico. A APA do Iraí tem 15% da sua área destinada à atividade agrícola, o que pode oferecer risco à qualidade da água do manancial, uma vez que é muito comum em áreas de cultivo a larga utilização de agroquímicos, o que pode caracterizar forte impacto sobre a qualidade dos corpos de água da região pelo assoreamento e carreamento de fertilizantes e poluentes. No entorno do reservatório existem diversas instalações potencialmente impactantes para a qualidade da água, como a Fazenda Experimental da UFPR, o Complexo Penitenciário que abriga a Colônia Penal Agrícola, o Hospital Adauto Botelho e o IAPAR (RELATÓRIO FINAL DO ZEE, 2000).

Tendo em vista a importância dessa área para o provimento de água para abastecimento público e do risco ao qual a APA do Iraí está exposta, esse trabalho se fez necessário. Além destes fatores, a ocorrência de uma denúncia, em janeiro de 2001, de que a Fazenda Experimental da Universidade estaria utilizando, indevidamente, agrotóxicos proibidos pela legislação, justamente numa área de Proteção Ambiental também foi decisiva para a escolha do local desse trabalho.

FIGURA 03 - MAPA DA REGIÃO DA APA DO IRAÍ COM SUAS SUBBACIAS. DESTAQUE PARA A REGIÃO DA FAZENDA CANGUIRI APRESENTANDO CONTAMINAÇÃO COM AGROQUÍMICOS



FONTE: Modificado de ZEE (2000)

O Jornal Folha do Paraná de 26 de janeiro de 2001 em uma reportagem relata que a Câmara Técnica da Área de Proteção Ambiental (APA) da bacia do Rio Iraí, formalizou uma denúncia junto ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP) de que as fazendas Estação Experimental Fazenda Escola Canguiuri, da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a Estação Experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), continuariam usando agrotóxicos na região. Na época, tanto o diretor da fazenda da UFPR quanto o da IAPAR, questionaram as denúncias (CERVI, 2001).

A Câmara Técnica, que formalizou a denúncia, temia que o uso de agrotóxicos contaminasse o lençol freático ou as águas do reservatório do Iraí, usadas para captação de água. Como a utilização dos clorados era comum em todas as áreas agrícolas do país é possível que ainda hoje existam vestígios de produtos clorados no subsolo da APA do Iraí.

O uso agrícola do hexaclorobenzeno (BHC) foi proibido no Brasil no final dos anos 70, mas até então era largamente utilizado como inseticida nas lavouras comerciais, em especial na cafeicultura. Estes produtos clorados chegam a permanecer no solo por até 50 anos (NAKAGAWA, 2003), já tendo sido relatados em diversos trabalhos alguns problemas decorrentes da contaminação e sendo também considerado um carcinógeno em potencial. A principal fonte de contaminação é através de alimentos contaminados. O BHC acumula-se nos peixes, mamíferos marinhos, aves, líquens, vegetais e em todos os animais que destes se alimentam, incluindo os seres humanos. A contaminação de seres humanos ainda pode ocorrer através da inalação de vapores de BHC (QUENTAL e MORAIS, 2006).

O BHC, um agrotóxico clorado conhecido como pó de broca, teve seu uso proibido devido à longa permanência de seus resíduos no solo. Ao entrar em contato com o organismo humano, o BHC atua sobre o sistema nervoso central, bloqueando a produção de acetilcolina e fazendo com que a pessoa intoxicada perca o controle muscular. Quando os músculos de alguns órgãos vitais são atingidos, a intoxicação pode inclusive levar à morte (NAKAGAWA, 2003).

O Instituto Ambiental do Paraná (IAP) doou uma área para a UFPR instalar suas atividades de ensino agropecuário que necessitem do uso de agrotóxicos. A nova fazenda escola está localizada em Castro (PR), colocando um fim ao impasse que perdurou entre os anos de 1996 e 2001 (CERVI, 2001).

1.3.2 Parque Ecológico Costa – Curitiba (PR)

Situado à Rua Nicola Pelanda, s/N, no bairro Umbará em Curitiba (PR), o Parque Ecológico Costa foi criado em um local onde anteriormente ocorria extração de areia e atualmente existe um pesque-pague (Figura 04). Não há nenhum relato de contaminação no local, o que possibilita o uso das espécies encontradas como controle negativo para o experimento.

FIGURA 04 - VISTA AÉREA DAS LAGOAS DO PARQUE ECOLÓGICO COSTA



Fonte: AREAL COSTA, 2006

O Areal Costa foi pioneiro no projeto de recuperação de uma antiga área degradada com extensão de mais de 1 milhão e 500 mil m², de onde foram retirados materiais durante 40 anos, surgindo, dessa forma, o Parque Ecológico Costa (AREAL COSTA, 2006).

O Parque Ecológico Costa é considerado pelo Instituto Ambiental do Paraná como parte integrante do Parque Metropolitano do Iguaçu. O Parque Metropolitano é um projeto do IAP para recuperação das áreas degradadas da várzea do Rio Iguaçu. Esse projeto tem uma extensão de 100 quilômetros e começa na nascente em São José dos Pinhais e engloba o Parque Náutico do Clube Atlético Paranaense, o Zoológico e o Parque Costa (AREAL COSTA, 2006).

O Parque Costa conta com uma equipe especializada para a conservação, preservação e readaptação da flora e fauna nativas em sua grande área destinada ao lazer, diversão e educação ambiental do público.

1.4 Químico utilizado no bioensaio – Sulfato de cobre (CuSO₄)

Entre os poluentes mais prejudiciais ao ecossistema estão os metais pesados, que podem ser definidos como elementos químicos que apresentam número atômico superior a 22 (NRIAGU, 1973). Entretanto, a definição mais difundida é aquela relacionada à saúde pública: “metais pesados são aqueles que apresentam efeitos adversos à saúde humana” (GAUTO, 2006). Estes elementos existem naturalmente no ambiente e a maioria deles são necessários, em concentrações mínimas, na manutenção da saúde dos seres vivos (XIMENES, 2006). No entanto, quando ocorre o aumento destas concentrações, efeitos deletérios começam a surgir.

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

Quando se avalia genotoxicidade em peixes, metais são um grupo de elementos bastante interessantes em se trabalhar, devido ao seu forte impacto na estabilidade de ecossistemas aquáticos e sua bioacumulação em organismos vivos (TARIFENO-SILVA et al., 1982).

O acúmulo de metais pesados e outros poluentes por organismos, pode ter efeito bastante abrangente, já que possibilita o transporte dos contaminantes via teia alimentar para diversos níveis tróficos da cadeia alimentar de tal forma que os predadores apresentam as maiores concentrações, ou seja, este efeito culmina com a ocorrência das maiores taxas de contaminação nos níveis mais altos da cadeia trófica (consumidores secundários e terciários) (BROWN, 1975).

O cobre, também sendo um metal pesado, em quantidade traço é essencial para a vida enquanto que em excesso é tóxico. Sua importância na saúde e na doença é bem documentada (BHUNYA; JENA, 1996), sendo um elemento essencial para a atividade de diversas enzimas biológicas. Também é predominantemente encontrado no núcleo e nas mitocôndrias de células vivas. Encontra-se estabelecido na literatura que o chumbo e o cobre chegam à água de consumo como resultado de corrosão dos materiais de encanamento. Contatos com o cobre podem ocorrer na agricultura em decorrência do uso de fungicidas e algicidas e nas indústrias de produção de cobre, de fabricação de fungicidas e na fundição de metais (BANU et al., 2004). Um número de metais presentes no ambiente ocupacional tem sido reportado na carcinogênese humana, entretanto não foi verificada correlação positiva entre exposição ao cobre e câncer (LINDER, 1983).

É reportado que depois da absorção o cobre liga-se à albumina do plasma e aos aminoácidos do sangue periférico e transportado para o fígado. Os sintomas que ocorrem imediatamente após a ingestão são gosto metálico na boca, dores abdominais, diarreias e vômitos. Ingestão de grandes quantidades de cobre pode causar toxicidade sistêmica incluindo hemólise, necrose hepática, sangramento gastro-intestinal, proteinúria, hematúria, taquicardia, convulsões, coma e morte (BANU et al., 2004).

No Brasil, a agroindústria é uma atividade que representa uma importante parcela da balança comercial. Desse modo, para garantir a eficiência dessa atividade, empresários e produtores utilizam-se de produtos químicos, há vários anos, com o intuito de garantir e maximizar suas produções (AZEVEDO-NETO e HESS, 1970). A administração desses produtos pode trazer conseqüências graves

ao meio ambiente, já que, sob a forma de contaminantes, mostram-se biodisponíveis a serem acumulados nos organismos. Como nem sempre essa administração ocorre de maneira controlada, seu uso indiscriminado prejudica as condições ambientais e os seres vivos participantes do ecossistema (BROWN, 1975).

Associado ao uso indiscriminado de pesticidas orgânicos sintéticos, um elevado número de pesticidas inorgânicos também é amplamente usado na agricultura. Sulfato de cobre, sendo um pesticida inorgânico de largo espectro, tem muitos usos na agricultura no combate a fungos, moluscos e pragas (BHUNYA; JENA, 1996). Também é freqüentemente usado na aqüicultura para reduzir a quantidade de fitoplâncton e controlar a floração de algas responsáveis por alterações no sabor da água, pois quando aplicada em dosagens até 0,5 mg/L é um poderoso algicida (CHEN; LIN, 2001).

A clastogenicidade do sulfato de cobre *in vivo* está sendo investigada há bastante tempo em diferentes sistemas teste, porém, os resultados têm se mostrado inconsistentes (BHUNYA; JENA, 1996). Segundo MATSUI (1980), não provocou danos ao DNA de procariotos; DE FLORA et al. (1984) reportaram sua propriedade não-mutagênica em diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* e o seu resultado negativo nos testes de reparo do DNA com diversas linhagens de *Escherichia coli* deficientes em reparo. Segundo OLIVER e MARZIN (1987), o resultado também foi negativo com o ensaio colorimétrico bacteriológico, o SOS cromosteste. Os efeitos clastogênicos *in vivo* foram reportados por BHUNYA e PATI (1987) e AGARWAL, SHARMA e TALUKDER (1990) em ratos, enquanto que TINWELL e ASHBY (1990) reportaram o efeito negativo na medula óssea de ratos pelo teste do micronúcleo. O forte potencial clastogênico do cobre foi reportado em plantas (ROSEN, 1964), entretanto, ele não induziu aumento na freqüência de troca de cromátides irmãs pelo teste com *Allium cepa* (HAZEN et al., 1988). SANCHEZ-GALAN et al. (2001) não observaram aumento na freqüência de micronúcleos em língulas, *Anguilla anguilla*, contaminadas com sulfato de cobre.

Entretanto, SINA et al. (1983) verificaram a indução de aberrações cromossômicas em hepatócitos de ratos tratados com sulfato de cobre e BHUNYA e JENA (1996) verificaram seu efeito clastogênico em filhotes de *Gallus domesticus* através dos ensaios de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em células da medula óssea. Poucos trabalhos testando a genotoxicidade desse composto foram realizados em peixes, porém, em um recente trabalho, CAVAS, GARANKO e ARKHIPCHUK (2005) verificaram em *Cyprinus carpio* e *Carassius gibelio*, que a dose 0,25 mg/L induziu aumento na frequência de micronúcleos em sangue periférico, células de brânquias e de fígado, e ainda destacou maior sensibilidade destes tecidos frente ao sangue periférico. Através dessa série de trabalhos, verifica-se uma contradição dos resultados observados ao longo dos anos, destacando assim a necessidade de realizar mais trabalhos que visem testar a genotoxicidade desse composto.

1.5 O Gênero *Astyanax*

A ictiofauna neotropical apresenta a maior diversidade e riqueza de peixes de água doce conhecida (LOWE-McCONNELL, 1999; NAKATANI et al., 2001), sendo que, segundo REIS; KULLANDER e FERRARIS JR (2003) atualmente existem mais de 4.000 espécies descritas e há estimativas de que possam existir cerca de 6.000.

A ordem Characiformes é o grupo dominante dentre os peixes de água doce da América do Sul, sendo a família Characidae a maior e a mais complexa desta ordem (FOWLER, 1948; GODOY, 1975; NELSON, 1984; BRITSKI; SILIMON; LOPEZ, 1999).

A posição taxonômica da família Characidae, segundo FINK e FINK (1981), é a seguinte:

CLASSE - Osteichthyes

SUBCLASSE - Actinopterygii

INFRACLASSE - Teleostei

SUPERORDEM - Osthariophysi

SÉRIE - Otophysi

SUBSÉRIE - Characiphysi

ORDEM - Characiformes

FAMÍLIA – Characidae

A ordem Characiformes apresenta 10 famílias com cerca de 237 gêneros e pelo menos 1343 espécies. Destas, cerca de 208 são africanas e o restante do Sudoeste dos Estados Unidos, do México e das Américas Central e do Sul (NELSON, 1994). Dentro desta ordem, encontra-se a família Characidae, a maior e mais complexa dentre as demais, compreendendo cerca de 30 subfamílias e aproximadamente 250 gêneros. Nesta família estão peixes de hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e que exploram uma grande variedade de habitats (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Espécies pertencentes a esta família ocorrem em praticamente todos os ambientes de água doce e distribuem-se nos continentes americanos, desde a fronteira México - Estados Unidos até o Sul da Argentina, e africano (LUCENA, 1993). Segundo FROESE e PAULY (2004), esta família possui 1406 espécies.

Os peixes da família Characidae, geralmente apresentam uma nadadeira caudal adiposa, são bons nadadores e incluem a maioria dos peixes de escamas conhecidos no Brasil, como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, dourado, entre outros. Variam de tamanho desde 2 cm, como os pequiras, até mais de um metro, como o dourado (BRITSKI, 1972). Segundo WEITZMAN e FINK (1983), essa família é um vasto grupo de peixes completamente heterogêneo e aparentemente polifilético.

Dentro da família Characidae, a subfamília Tetragonopterinae, é um grupo bastante diversificado, com muitos gêneros e espécies, podendo ser encontrada ao longo da América do Sul e da América Central. Estes tetragonopteríneos são conhecidos popularmente como lambaris na região Sul e como piabas na região Central (BRITSKI, 1972), com a maioria das espécies onívora e hábitos de forrageamento muito ativos (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988).

Os tetragonopteríneos mais freqüentes nos riachos do sudeste do Brasil são espécies dos gêneros *Astyanax*, *Bryconamericus*, *Deuterodon*, *Hollandichthys*, *Moenkhausia*, *Piabina*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* (GODOY, 1975; BUCKUP, 1999).

O gênero *Astyanax* foi inicialmente proposto por Baird & Girard (1854) e a primeira revisão mais completa deste gênero foi realizada por EIGENMANN (1921) e EIGENMANN (1927), que validou 74 espécies e subespécies. Posteriormente, GÈRY (1977) enumerou uma lista de 62 espécies e subespécies em água doce do Brasil. A revisão mais recente, realizada por LIMA et al., (2003), cita 86 espécies e as poucas subespécies existentes foram elevadas a espécies.

Esses lambaris são altamente utilizados para consumo humano, porém apresentam médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Por outro lado, possuem grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Além disso, são considerados transformadores de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez deverá alimentar aves e peixes pertencentes a níveis tróficos superiores, como os piscívoros.

Estudos taxonômicos feitos por SAMPAIO (1988), mostram que existem pelo menos sete espécies do gênero *Astyanax* no rio Iguaçu, das quais apenas uma está nominada (*Astyanax gymnogenys* = sp A) sendo as demais denominadas de *Astyanax* sp B, C, D, E e F. Segundo AGOSTINHO e GOMES (1997) existe mais uma espécie, denominada *Astyanax* sp G. Muitas espécies do gênero *Astyanax* são morfologicamente similares e sua separação tem sido historicamente difícil (MELO, 2001), formando um complexo do ponto de vista taxonômico (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004). Dessa forma, e também devido às suas características biológicas e citogenéticas, esse gênero tem

recebido, atenção especial por parte de alguns pesquisadores (MORELLI et al., 1983; MOREIRA-FILHO, 1989).

Espécies do gênero *Astyanax* têm sido consideradas, em grande parte dos estudos já realizados, como zooplancívoras, insetívoras e onívoras, tendo papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas (SANTOS, 1981).

A espécie *Astyanax sp B* (Figura 05), endêmica no rio Iguçu, no entanto, apresenta um comportamento trófico distinto, alimentando-se basicamente de vegetais (representados principalmente por gramíneas), o que permite classificá-la como herbívora. No entanto, essa classificação, como referido anteriormente, deve ser considerada temporária, tendo em vista alguns aspectos que evidenciam seu comportamento alimentar oportunista. Apesar do alto consumo de matéria vegetal, essa espécie não apresenta características morfológicas de um herbívoro típico (intestino longo, estômago bem delimitado, dentes faríngeos, etc). Assim, a presença marcante de vegetais nos conteúdos estomacais leva a crer que essa espécie esteja se comportando como oportunista, explorando um novo recurso abundante e disponível, em função do alagamento das margens dominadas por gramíneas (AGOSTINHO; GOMES, 1997). A dieta de *Astyanax sp B* apresenta um espectro alimentar relativamente amplo, representado por material de origem vegetal e animal. A proporção, entretanto, é muito discrepante, com os vegetais compreendendo cerca de 91,8% da dieta (AGOSTINHO; GOMES, 1997).

A espécie *Astyanax altiparanae* (Figura 06) distribui-se pela bacia do alto rio Tibagi (SHIBATTA et al., 2002) e bacia do alto rio Iguçu (GRAÇA; PAVANELLI, 2002). Caracteriza-se por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI; BRITSKI, 2000) sendo esta espécie conhecida popularmente por lambari relógio ou lambari-de-rabo-amarelo. Contudo, como esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes, as populações desse lambari não são homogêneas quanto à morfologia.

Essa espécie apresenta grande capacidade adaptativa exploratória, utilizando estratégias diferenciadas na estrutura da população (ORSI; SHIBATA; SILVA-SOUZA, 2002). Portanto, a elevada plasticidade alimentar de *Astyanax altiparanae*, bem como sua capacidade de se reproduzir em todos os ambientes, explicam o sucesso desta espécie no processo de colonização de novos habitats. Entretanto, observa-se uma preferência pela permanência em águas mais lânticas.

FIGURA 05 - EXEMPLAR DE *Astyanax sp B*. Barra=2 cm

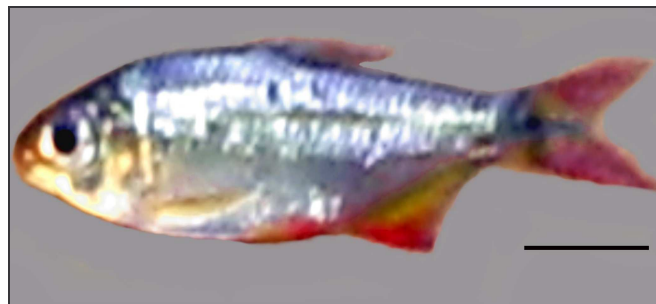
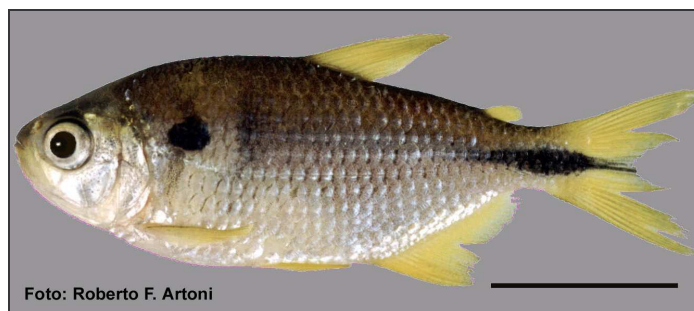


FIGURA 06 - EXEMPLAR DE *Astyanax altiparanae*. Barra=3 cm



2. JUSTIFICATIVA

Diante da ampla distribuição e relativa abundância do gênero *Astyanax*, neste trabalho foram utilizadas duas espécies (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) para verificar se existe diferença significativa de respostas aos xenobiontes a que ambas estão expostas tanto em situação natural (Fazenda Cangüiri e Parque Costa) como em bioensaio com sulfato de cobre. Além disso, frente à escassez de dados de genotoxicidade de espécies nativas, esse trabalho se fez necessário na tentativa de gerar bancos de dados mais consistentes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se o gênero *Astyanax* pode representar um bom biomonitor independente da espécie e avaliar se existe diferença significativa entre duas espécies de *Astyanax* quando utilizadas como biomonitores de genotoxicidade ambiental.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar se existe diferença entre a contaminação da Fazenda Experimental Cangüiri (UFPR) e o Parque Ecológico Costa utilizando os testes de genotoxicidade: Micronúcleo Písceo, Ensaio Cometa com sangue, fígado e rim;
- Verificar se existe diferença significativa de respostas entre as duas espécies do gênero *Astyanax*;
- Através da realização de um bioensaio com sulfato de cobre verificar o efeito desse composto no material genético das espécies e comparar as respostas entre as espécies do gênero frente a esse químico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

O gênero *Astyanax* foi escolhido por ser amplamente distribuído e de relativa abundância. *Astyanax sp B* é uma espécie nativa enquanto *A. altiparanae* é considerada introduzida. Esses animais também foram selecionados baseando-se no fato de que eles sobrevivem bem em laboratório, o que possibilitou sua utilização na realização do bioensaio.

Para o biomonitoramento, os 114 exemplares utilizados foram coletados com rede de arrasto com malha de 0,8 cm entre nós. Após a coleta foram mantidos em recipientes com água, devidamente aerados, para transporte. Os peixes foram levados ao Laboratório de Citogenética Animal, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, onde foram anestesiados e posteriormente sacrificados.

Os animais utilizados no bioensaio, num total de 75 exemplares, foram adquiridos em uma piscicultura e mantidos no Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná em tanques de 250 litros por duas semanas para aclimação, tendo algumas condições controladas como temperatura, mantida entre 20 e 22°C e o fotoperíodo de 12 h/claro e 12 h/escuro. Durante a aclimação foram alimentados com ração comercial com freqüente limpeza dos tanques e aeração constante.

Após o sacrifício, os peixes foram fixados em formaldeído 10% por 24 horas e em seguida mantidos em álcool 70% para posterior classificação das espécies. Essa classificação foi realizada pelo Dr. Vinícius Abilhoa, curador da coleção de peixes do Museu de História Natural do Capão da Imbuia.

4.2 Biomonitoramento

Foram coletados ao total, 114 exemplares de lambari, pertencentes às espécies *Astyanax sp B* e *A. altiparanae* em dois locais distintos: a Fazenda Experimental do Cangüiri e o Parque Ecológico Costa. Foram realizadas três coletas em cada um dos locais, durante o período de um ano, respectivamente em abril e novembro de 2005 (abr/05, nov/05) e abril de 2006 (abr/06) na Fazenda Cangüiri (Figura 07) e em fevereiro e outubro de 2005 (fev/05, out/05) e fevereiro de 2006 (fev/06) no Parque Costa.

FIGURA 07 – COLETA REALIZADA NA FAZENDA CANGUIRI COM REDE DE ARRASTO MALHA 0,8 CM ENTRE NÓS. NOV/05



FONTE: A autora

Os animais coletados foram transportados até ao laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental do Setor de Ciências Biológicas e sacrificados em seguida. Não houve período de aclimação, para evitar possível reversão dos danos. Cada animal foi analisado verificando a frequência de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares e quebras no DNA detectadas pelos ensaios cometa em eritrócitos e em células dos tecidos hepático e renal.

4.3 Bioensaio

Para o bioensaio, os peixes foram adquiridos em piscicultura e mantidos em número de quatro exemplares para cada aquário de 18 litros por um período de duas semanas para aclimação.

Para cada uma das espécies foram montados cinco aquários para o grupo controle, totalizando vinte peixes. O mesmo foi realizado para os *Astyanax* contaminados *in vivo* com sulfato de cobre, cinco aquários com quatro animais em cada um (Figura 08). A dose do sulfato de cobre utilizada no bioensaio foi de 0,25 mg/L, sendo esta baseada em dados da literatura (CAVAS, GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005). Os lambaris ficaram expostos ao contaminante dissolvido na água por um período de 72 horas. Decorrido o tempo de exposição, os peixes foram sacrificados e os tecidos submetidos aos testes de micronúcleo píceo e ensaios cometa com células de sangue e dos tecidos hepático e renal.

FIGURA 08 – BIOENSAIO COM SULFATO DE COBRE, REALIZADO COM A ESPÉCIE *Astyanax sp B* – SISTEMA DE AQUÁRIOS DO LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA ANIMAL E MUTAGÊNESE AMBIENTAL – UFPR



FONTE: A autora

4.4 Biomarcadores

Os testes de genotoxicidade utilizados nos peixes coletados no ambiente para o propósito de biomonitoramento e naqueles submetidos ao bioensaio, foram: teste de micronúcleo písceo, para avaliação da frequência de micronúcleos e outras anormalidades morfológicas nucleares; ensaio cometa de sangue e ensaio cometa em células dos tecidos hepático e renal, para análises de quebras no material genético.

4.4.1 Teste do Micronúcleo Písceo

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

A técnica aplicada consistiu das etapas:

- a) As lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) Ao se coletar o sangue do peixe, 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 (técnica de extensões sanguíneas).
- c) Foi confeccionada uma lâmina por peixe.
- e) As lâminas, após a secagem ao ar, foram fixadas em etanol 96% por 30 minutos em cubetas.
- f) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 10 minutos e lavadas em água corrente.
- g) Foram analisadas 2000 células de cada peixe 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, apresentavam-se 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 enquadraram no conceito de micronúcleo, também foram analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

4.4.2 Ensaio Cometa

A técnica utilizada foi a descrita por SPEIT e HARTMANN (1999), sendo feitas algumas alterações, conforme FERRARO, 2003. Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) segundo as etapas descritas a seguir.

Preparação das lâminas com cobertura de agarose

- a) Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi então levada ao forno de microondas até sua fervura e completa dissolução.
- b) Após fervura, a agarose foi deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta foi picada e levada novamente ao forno de microondas. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Ao final desse processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.
- c) As lâminas, previamente limpas, foram então mergulhadas na agarose aquecida, sendo o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada limpo com um lenço de papel.
- 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) Foram dissolvidos 100 mg de agarose normal em 20 ml de PBS.
- b) Essa solução foi então levada para fervura em forno de microondas somente uma vez.
- c) A agarose foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando foi então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

Os animais sacrificados foram previamente anestesiados e o material coletado (sangue e tecidos hepático e renal) foi armazenado em tubo de microcentrífuga do tipo ependorf e mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz até a montagem das lâminas.

4.4.2.1 Ensaio Cometa com Sangue

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

- a) Foram coletados 10 µl de sangue de cada animal e misturados com 1 ml de soro bovino fetal. Desta solução, foram coletados 10 µl e misturados com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).
- b) Esta suspensão celular foi então depositada sobre uma lâmina que já estava com a cobertura de agarose.
- c) Após a deposição da mistura agarose LMP e suspensão celular sobre 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 gentilmente retiradas.
- e) As lâminas foram acondicionadas em cubetas contendo a solução de lise por 24 horas.
- f) Após o tempo na solução de lise, as lâminas foram 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 mantida sob refrigeração e no escuro.
- h) Na cuba de eletroforese, foi suavemente adicionada 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 três seções, com 5 minutos para cada seção. A neutralização foi realizada aplicando diretamente o tampão 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 adicionados 25 µl de brometo de etídeo em cada lâmina. Cada lâmina foi coberta com lamínula e levada ao microscópio de epifluorescência com aumento de 400x.
- q) Foram analisados, em teste cego, 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. Os núcleos foram classificados em: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo destruído ou em apoptose).
- s) Foi realizada 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.

4.4.2.2 Ensaio Cometa com células de Fígado e de Rim

No dia da coleta do material, antes do sacrifício dos animais, foi preparado o tampão Tris-HCl Sacarose, dissolvendo-se 17,11 g de sacarose e 0,24 g de Tris em 100 ml de água destilada e tendo o pH ajustado em 8,6 com HCl_{conc}. Esse tampão foi mantido sob refrigeração até o momento do uso para evitar possível contaminação por fungos. O tampão de homogeneização e o procedimento para montagem das lâminas foram realizados segundo RAMSDORF (2005). O procedimento para montagem das lâminas com os tecidos consistiu das seguintes etapas:

- a) Após cada animal ser anestesiado e ter seu sangue retirado para os testes de micronúcleo e ensaio cometa (células circulantes), foi feita uma incisão ventral longitudinal desde a abertura anal até a região da cabeça para expor a cavidade abdominal e os órgãos internos.
- b) Foram retirados os tecidos hepático e renal de cada animal.
- c) Cada um destes tecidos foi acondicionado em frasco de microcentrifuga do tipo ependorf contendo 1ml de tampão de homogeneização. Estes frascos foram armazenados sob refrigeração e na ausência de luz.

- d) O tampão com o tecido foi levado para desagregação em homogeneizador Potter a 1500 rpm por cerca de 30 segundos.
- e) Foram coletados 50 µl do homogeneizado obtido.
- f) Estes 50 µl de homogeneizado foram misturados com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).
- g) A suspensão celular assim obtida foi utilizada para a montagem das lâminas, conforme os mesmos procedimentos utilizados para montagem das lâminas com o sangue.

4.4.3 Análise estatística

Foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis através do programa BioEstat 2.0. O teste de Mann-Whitney foi empregado em todos os biomarcadores (teste do micronúcleo píceo, ensaio cometa com células sanguíneas, hepatócitos e células renais) para comparar diferenças entre os locais de coleta e comparar as respostas das duas espécies em cada um dos locais. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação entre as coletas, em cada um dos locais. Para a análise do bioensaio com sulfato de cobre o teste estatístico usado foi o teste de Mann-Whitney. O nível de significância considerado nas análises foi de 0,05. O programa Excell para Windows foi utilizado para o cálculo das medianas e para a elaboração dos gráficos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Biomonitoramento

O crescimento populacional e industrial vem contribuindo, progressivamente, na ampliação dos impactos ambientais nos ambientes aquáticos. A poluição dos ecossistemas aquáticos pode provocar a perda da biodiversidade, implicando na diminuição ou desaparecimento de várias populações. Assim, estudos de monitoramento nesses ecossistemas são fundamentais, pois a saúde dos peixes reflete a qualidade e a sustentabilidade destes ecossistemas. A contaminação dos recursos aquáticos também é alvo das preocupações humanas, tendo em vista que o consumo direto e indireto de águas contaminadas pode causar sérios danos ao organismo.

A utilização de amostras complexas, como as que caracterizam as ambientais, requer o uso de diversas abordagens para sua melhor avaliação toxicológica. O uso de diferentes ensaios e sistemas biológicos garante uma triagem mais acurada dos efeitos causados por amostras de ambientes poluídos. Nesse sentido, vários biomarcadores estão sendo desenvolvidos e dentre eles, os biomarcadores genéticos vêm alcançando grande aceitação.

O monitoramento de efeitos clastogênicos ocasionados pelos poluentes é de grande importância em ambientes aquáticos quando se pretende avaliar o estresse ocasionado pela poluição em organismos vivos. Químicos mutagênicos possivelmente originam lesões no DNA de animais aquáticos, incluindo quebras na fita, modificação de bases e ligações transversais, ocasionando efeitos adversos na estabilidade dos ecossistemas (KURELEC, 1993). Neste trabalho, buscamos, através de parâmetros genotóxicos, estabelecer algumas relações entre os dois locais de coleta analisados: Fazenda Experimental Cangüiri e Parque Ecológico Costa, durante o período de um ano (2005-2006).

5.1.1 Coletas realizadas

Foram realizadas três coletas em cada um dos dois locais analisados. No Parque Ecológico Costa, foram coletados 52 lambaris, sendo 34 *Astyanax sp B* (12 em fev/05, 9 em out/05 e 13 em fev/06) e 18 *A. altiparanae* (nenhum em fev/05, 8 em out/05 e 10 em fev/06). Na Fazenda Cangüiri, foram coletados 62 lambaris, sendo 28 *Astyanax sp B* (16 em abr/05, 2 em nov/05 e 10 em abr/06) e 34 *A. altiparanae* (5 em abr/05, 21 em nov/05 e 8 em abr/06).

A literatura recomenda um número maior de animais coletados em estudos de biomonitoramento do que os indicados para bioensaios, visando reduzir os efeitos das variações inter-individuais. BELPAEME, COOREMAN e KIRSCH-VOLDERS (1998) recomendam para estes tipos de análises 25 peixes por local de amostragem. Isso foi parcialmente conseguido, pois quando se analisa o número total de indivíduos coletados no presente trabalho, este parece suficiente para as duas espécies, porém quando se pretende fazer uma análise cronológica dos dados, separando os animais obtidos nas diferentes coletas, esse número se mostrou reduzido, devido à dificuldade encontrada em se obter números elevados de exemplares das duas espécies em cada coleta.

Na primeira coleta no Parque Costa (fev/05), o número de indivíduos coletados foi considerado muito baixo e desproporcional, pois obteve-se 12 *Astyanax sp B* e nenhum exemplar de *A. altiparanae*. Na segunda coleta (out/05), apesar de terem sido coletados exemplares das duas espécies e em quantidade proporcional (9 exemplares de *Astyanax sp B* e 8 de *A. altiparanae*), esse número foi considerado também reduzido. Na terceira coleta (fev/06) foram coletados 23 lambaris, sendo 12 *Astyanax sp B* e 11 *A. altiparanae*. Nesta última coleta, o número de lambaris foi um pouco maior que na coleta anterior e também apresentou proporção entre as duas espécies, o que possibilitou que essa fosse considerada a mais apropriada para as análises estatísticas quando o intuito foi comparar as respostas das duas espécies nos diferentes testes. Porém, ressalta-se aqui que esse número foi também reduzido, já que o ideal seria termos coletado aproximadamente 25 animais de cada uma das espécies por coleta.

Na Fazenda Experimental do Cangüiri a mesma situação foi verificada. Na primeira coleta (abr/05) foram capturados 21 lambaris, sendo 16 *Astyanax sp B* e somente 5 *A. altiparanae*. Na segunda coleta (nov/05) foram capturados 21 exemplares de *A. altiparanae* e somente 2 indivíduos de *Astyanax sp B*. Nestas coletas, apesar de terem sido conseguidos números elevados de lambaris (21 na primeira coleta e 23 na segunda) podemos observar uma proporção bastante desequilibrada entre os números de exemplares coletados de cada uma das espécies. Na terceira coleta (abr/06) foram capturados 10 indivíduos da espécie *Astyanax sp B* e 8 da espécie *A. altiparanae*. Nessa última, o número de indivíduos de cada uma das espécies também foi considerado reduzido, porém o mais indicado para análises estatísticas, devido à proporção mais equilibrada entre o número de indivíduos das duas espécies.

Os resultados estão apresentados em forma de tabelas na seção de apêndices por ordem cronológica dentro de cada local de coleta, sendo Parque Ecológico Costa – Apêndices 01 (fev/05), 02 (out/05) e 03 (fev/06) e Fazenda Experimental Cangüiri – Apêndices 04 (abr/05), 05 (nov/05) e 06 (abr/06). Nas referidas tabelas estão dispostos por espécie os resultados de micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares e os escores do ensaio cometa do sangue, das células do fígado e das células do rim.

Os dados obtidos nas coletas 1 e 2 nos dois locais foram utilizados para analisar diferenças entre os locais e possíveis diferenças entre os períodos de coletas. Na terceira coleta, nos dois locais, os dados foram utilizados para avaliar possíveis diferenças entre os locais de coleta, entre as épocas de coletas e também para verificar se havia diferenças de respostas entre as espécies, já que nesta última o número de lambaris coletados das duas espécies foi mais uniforme e por isso, considerado mais adequado para esta análise.

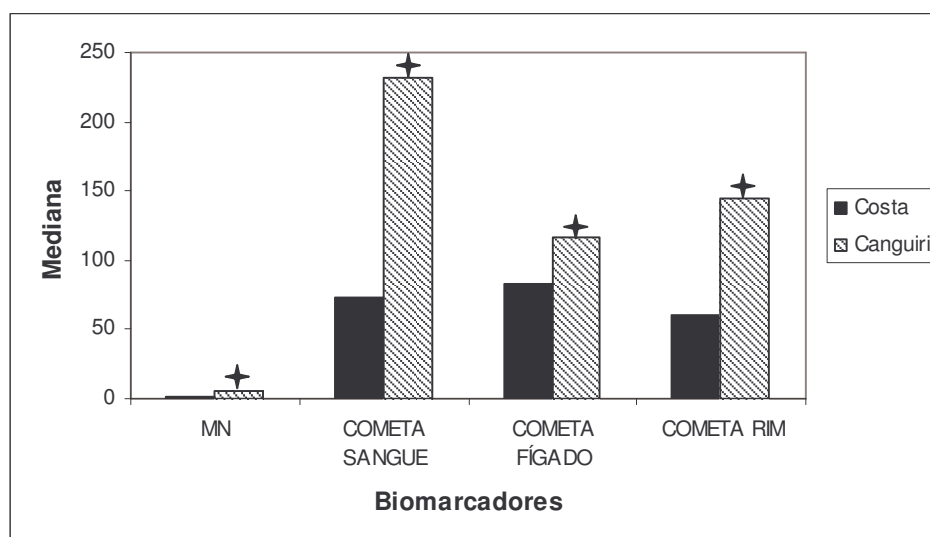
Foram feitos dois tipos de análises para a comparação entre os locais de coleta através do teste estatístico de Mann-Whitney. Inicialmente, a análise estatística foi realizada reunindo os dados das três coletas, porém mantendo as espécies separadas. Em seguida, foi feita análise separando as coletas entre si.

5.1.2 Comparação entre os locais de coleta

Para comparar os dois locais de coleta, foi feita uma análise conjunta dos dados, tendo sido reunidos os dados de todos os indivíduos *Astyanax sp B* coletados nos dois locais (Parque Costa e Fazenda Cangüiri), sendo o mesmo feito com os indivíduos de *A. altiparanae*. Porém, as duas espécies foram sempre analisadas separadamente.

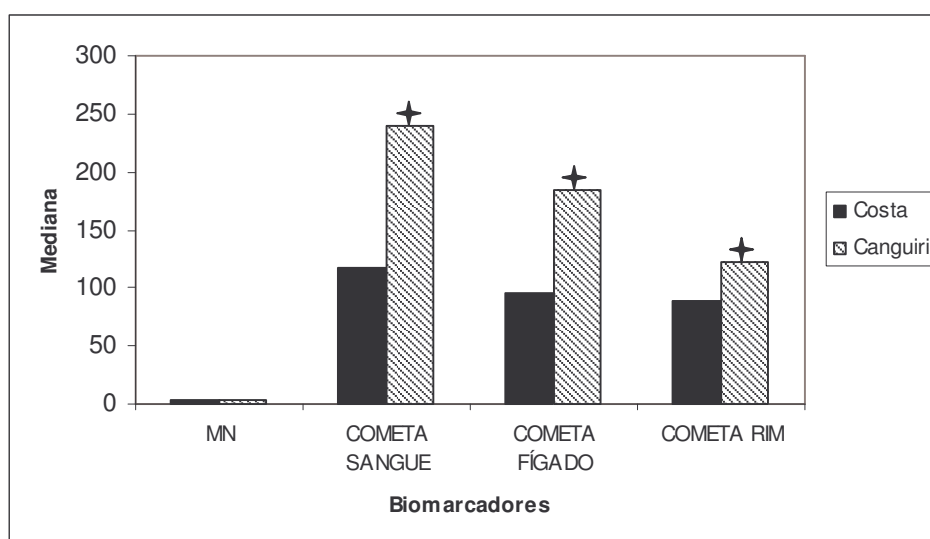
Da espécie *Astyanax sp B* foram coletados 34 indivíduos no Parque Costa e 28 na Fazenda Cangüiri e ao comparar os dois locais podemos verificar que todos os biomarcadores utilizados se mostraram sensíveis ao indicar que a Fazenda Cangüiri apresenta maior grau de dano, o que pode ser atribuído a um maior grau de contaminação deste local, tendo sido observado elevado grau de significância ($p=0$) no teste do micronúcleo píceo e nos ensaios cometa realizados com sangue e com células do tecido renal da mesma forma que o observado no ensaio cometa em células do tecido hepático ($p=0,0003$) (Figura 09).

FIGURA 09 – COMPARAÇÃO ENTRE OS LOCAIS DE COLETA (PARQUE COSTA E FAZENDA CANGÜIRI) REALIZADA ATRAVÉS DE MEDIANA DOS DIFERENTES BIOMARCADORES ANALISADOS NA ESPÉCIE *Astyanax sp B* ($\dagger p<0,05$)



Da espécie *Astyanax altiparanae* foram coletados ao todo 18 exemplares no Parque Costa e 34 na Fazenda Cangüiri. Ao comparar os dois locais, o teste do micronúcleo não apresentou diferença significativa ($p=0,3172$) porém, os ensaios cometa detectaram diferença, com elevados níveis de significância nos tipos celulares analisados, em sangue e células do fígado ($p=0$) e células do rim ($p=0,0061$), mostrando sempre os animais coletados na Fazenda Cangüiri com maior grau de dano (Figura 10).

FIGURA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE OS LOCAIS DE COLETA (PARQUE COSTA E FAZENDA CANGÜIRI) REALIZADA ATRAVÉS DE MEDIANA DOS DIFERENTES BIOMARCADORES OBSERVADOS NA ESPÉCIE *Astyanax altiparanae* ($\dagger p<0,05$)



Esses resultados sugerem que as duas espécies de lambaris utilizadas podem ser utilizadas como biomonitores, sendo ainda a espécie *Astyanax sp B* um pouco mais sensível, por ter mostrado diferença entre os locais inclusive no teste do micronúcleo píceo.

O teste do micronúcleo píceo detecta DNA extranuclear resultante de qualquer quebra cromossômica durante a divisão celular ou eventos de perda de cromossomos durante a divisão celular. Esse teste com peixes vem sendo mostrado como uma técnica bastante útil *in vivo* para testar a genotoxicidade e

também apresenta um grande potencial para monitoramento *in situ* de qualidade de água (KIM; HYUN, 2006). Quando os peixes são utilizados como biomonitores, algumas classes de contaminantes encontrados nos ambientes aquáticos aumentam significativamente a frequência de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares, como por exemplo, mercúrio orgânico (PORTO, ARAÚJO e FELDBERG, 2005), hidrocarbonetos clorados (DDTs e PCBs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HOSE et al., 1987).

O ensaio cometa detecta quebras na fita de DNA e locais álcali-labeis através da medição da migração do DNA (SINGH et al., 1988) e também têm como vantagens a utilização de qualquer tecido de interesse, sua relativa facilidade e a geração de dados ao nível celular individual. Muitos pesquisadores têm avaliado o ensaio cometa como um método para monitoramento dos efeitos dos agentes que danificam o DNA em organismos aquáticos marinhos e de água doce (PANDRANGI et al.; 1995; NACCI; CAYULA; JACKIM, 1996; BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Entretanto, poucos trabalhos comparam os resultados do ensaio cometa com o teste de micronúcleo para avaliação da genotoxicidade de ambientes aquáticos (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). KIM e HYUN (2006) ao comparar os resultados dos testes de micronúcleo e ensaio cometa em organismos aquáticos verificaram elevada concordância entre os ensaios, com maior sensibilidade do ensaio cometa frente a dois diferentes agentes mutagênicos (N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina e benzopireno), concordando com HARTMANN et al., 2001; DIXON et al., 2002; KLOBUCAR et al., 2003. O ensaio cometa também apresentou maior correlação dose-resposta do que o teste do micronúcleo. Quanto à sensibilidade dos tecidos estudados, JIN; LEE e HYUN (2004) demonstraram menor sensibilidade do sangue quando comparado ao fígado e brânquias de carpas.

Nossos resultados também mostram o ensaio cometa com maior sensibilidade do que o teste do micronúcleo písceo. Pode-se deduzir que essa sensibilidade maior do ensaio cometa seja decorrente da natureza do dano que cada teste detecta: enquanto o teste do micronúcleo detecta danos bruscos ao

DNA, o ensaio cometa já é capaz de detectar uma quebra em 1×10^{10} Da (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Nossos resultados também mostraram maior sensibilidade de resposta com o sangue quando comparado com as respostas observadas nos tecidos, indicando maior adequação das células sanguíneas para se detectar a presença de mutagênicos em águas, discordando dos resultados encontrados por JIN; LEE e HYUN (2004). Essa diferença pode ter ocorrido pela utilização de diferentes espécies de peixes, que evidentemente apresentam diferenças de metabolismos, como também pode ter ocorrido pela utilização de diferentes agentes mutagênicos.

Já foi verificado em diversos estudos, tanto *in situ* quanto em bioensaios, que determinadas espécies não são adequadas para estudos de biomonitoramento, pois não respondem à presença de contaminantes no ambiente aquático, enquanto que outras espécies são capazes de detectar a presença destes. SANCHEZ-GALAN; LINDE e GARCIA-VAZQUEZ (1999) relataram a adequação da espécie *Salmo trutta* para detectar a presença dos metais cádmio e mercúrio e a falta de sensibilidade da espécie *Phoxinus phoxinus* frente ao mercúrio; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2000) verificaram a sensibilidade da espécie *Poecilia latipinna* também frente ao cádmio e ao mercúrio e novamente a falta de sensibilidade de *P. phoxinus* ao mercúrio; GRISOLIA e CORDEIRO (2000), ao trabalharem em bioensaios com ciclofosfamida e mitomicina no teste do micronúcleo písceo, constataram maior sensibilidade da espécie *Tilapia rendalli* do que as espécies *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*. LEMOS et al. (2005), analisando diferenças de resposta entre espécies em análises *in situ*, também observaram a adequação da espécie *Tilapia rendalli* como bioindicadora de genotoxicidade em ambiente lacustre.

A posição de determinada espécie na cadeia alimentar pode influenciar a sua sensibilidade frente aos poluentes. PORTO, ARAUJO e FELDBERG (2005), ao trabalhar com as espécies *Prochilodus nigricans* (detritívora), *Mylossoma duriventris* (onívora) e *Hoplias malabaricus* (piscívora), observaram que a frequência de micronúcleos na espécie piscívora foi maior do que nas espécies

detritívora e/ou onívora. Os autores sugerem três fatores para essa diferença: *Hoplias malabaricus*, sendo uma espécie carnívora, está em um elevado nível trófico, estando sujeito a eventos de biomagnificação; a espécie habita normalmente pequenos riachos onde os baixos valores de pH e de condutividade favorecem a produção e bioacumulação de metilmercúrio (forma mais tóxica que o metal mercúrio na sua forma inorgânica). Também o fato de a espécie apresentar um comportamento sedentário pode contribuir para que ela fique continuamente em contato com o mercúrio presente no ambiente.

Dessa forma, tornam-se necessários mais estudos visando à verificação de quais espécies podem ser usadas nas análises de biomonitoramento. Algumas como *Phoxinus phoxinus* e *Genyonemus lineatus* apresentam falta de sensibilidade a diversos poluentes, como destacaram RODRIGUEZ-CEA; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2003.

Portanto, antes de se escolher qual espécie se irá utilizar para o propósito de biomonitoramento, são necessários conhecimentos anteriores sobre a dieta de cada espécie candidata, análises comportamentais e detalhes sobre seu metabolismo. Também se recomenda a utilização de bioensaios para verificar se a espécie escolhida responde realmente quando frente às pequenas concentrações de diferentes agentes mutagênicos encontrados no ambiente.

Nós verificamos que as espécies de *Astyanax* respondem bem em análises ambientais, sendo dessa forma recomendados como bons biomonitores de contaminação ambiental. Aliado a isso, também podemos atribuir maior adequação quando se observa a ampla distribuição geográfica destas espécies e a grande diversidade de ambientes onde são encontrados. As espécies de *Astyanax* estudadas no presente trabalho se mostraram sensíveis ao indicar maior contaminação na Fazenda Cangüiri. Tendo em vista que os animais coletados na Fazenda são também consumidos, isso causa sérias preocupações, uma vez que a provável fonte de contaminação seja constituída por agrotóxicos, que são bioacumulados nos tecidos dos peixes e podem vir a contaminar o homem que se alimenta destes peixes. Além disso, a área em questão trata-se de uma região

próxima a uma barragem destinada à captação de água para abastecimento público, o que faz com que o problema atinja proporções ainda maiores.

A toxicidade dos organoclorados não é mais questionada. LIU et al. (2004) relataram a inibição do crescimento da raiz e quebras no DNA de diferentes tecidos em *Glycine max*, quebras estas detectadas através do ensaio cometa, após a exposição a diferentes organoclorados.

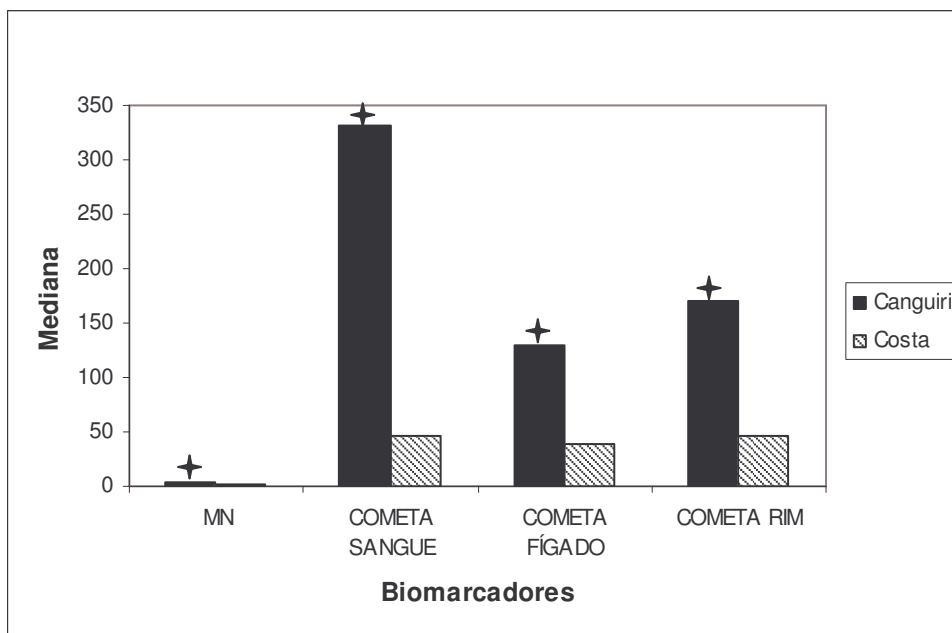
Através das análises dos nossos dados, verificamos ainda que o Parque Costa pode ser considerado um ponto referência quando se trabalha com peixes naturais de água doce. Por se tratar de um local próximo a um centro metropolitano, esse parque merece destaque por fornecer animais com baixos índices de danos ao material genético. A importância desse ponto nas análises ambientais também é evidenciada quando se avalia que as condições climáticas encontradas no local referência (Parque Costa) são semelhantes às aquelas encontradas no local pesquisado (Fazenda Experimental do Cangüiri).

5.1.3 Comparação entre os locais nas diferentes coletas

Tendo em vista que as coletas em cada um dos locais foram realizadas em épocas do ano coincidentes e que em uma análise ambiental diversos fatores como temperatura e precipitação podem estar agindo e interferindo nos resultados, foi realizada comparação estatística entre os locais em cada uma das coletas.

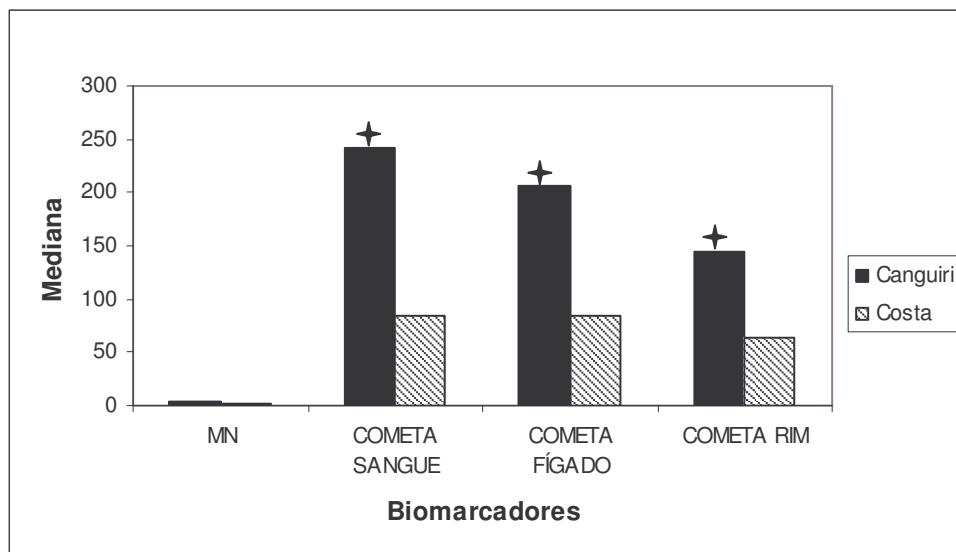
Na coleta 1 no Parque Costa (fev/05) e na Fazenda Cangüiri (abr/05) obteve-se 12 e 16 exemplares de *Astyanax sp B*, respectivamente. Os dois locais foram comparados utilizando o teste estatístico de Mann-Whitney. Observou-se maior grau de lesão na Fazenda Cangüiri, tanto no teste do micronúcleo písceo ($p=0,0008$) quanto para os ensaios cometa com células de sangue, de fígado e de rim ($p=0$) (Figura 11).

FIGURA 11 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE OS LOCAIS DE COLETA - COLETA 1 (FEV/05 E ABR/05) BIOMONITOR: *Astyanax sp B* († $p < 0,05$)



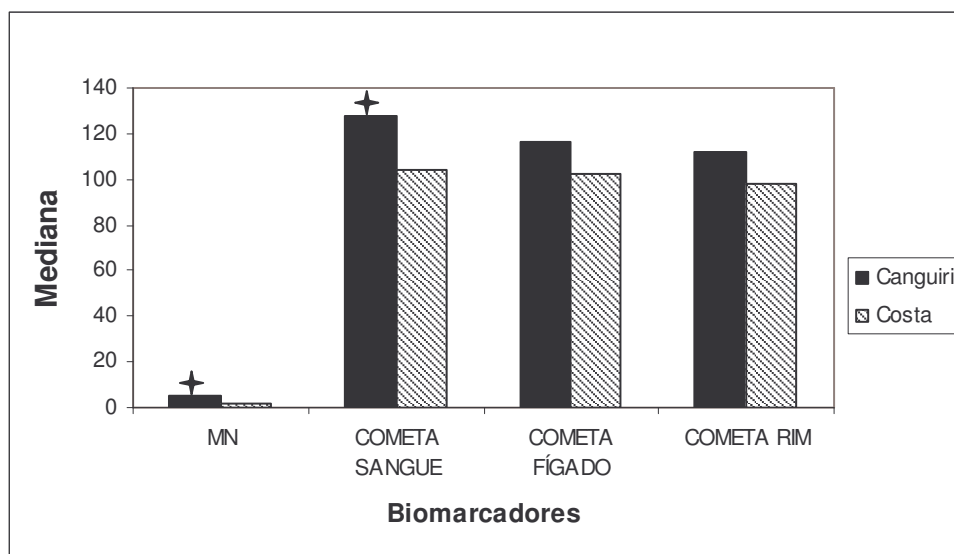
Na coleta 2 foi realizada a comparação entre os locais: Parque Costa (out/05) e Fazenda Canguiri (nov/05). Foi somado o número de peixes das duas espécies de *Astyanax*. Nessa análise, portanto, tínhamos 17 lambaris do Parque Costa e 23 da Fazenda Canguiri. O teste estatístico utilizado foi o de Mann-Whitney, sendo que o biomarcador micronúcleo písceo não detectou diferença entre os dois locais ($p=0,2985$), enquanto que os ensaios cometa, com todos os tipos celulares analisados (sangue, fígado e rim), apresentaram diferença significativa ($p=0$), indicando, novamente, os animais da Fazenda Canguiri com maior grau de dano no DNA (Figura 12).

FIGURA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRÔNÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE OS LOCAIS DE COLETA - COLETA 2 (OUT/05 E NOV/05) BIOMONITOR: AS DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* († $p < 0,05$)



Na coleta 3 foi novamente feita a comparação entre os dois locais somando os exemplares das duas espécies. No Parque Costa (fev/06) e na Fazenda Canguiri (abr/06) coletamos 23 e 18 lambaris respectivamente. Tanto o teste do micronúcleo písceo ($p=0,0012$) quanto o ensaio cometa com sangue ($p=0,0058$) mostraram maior lesão nos peixes coletados na Fazenda Canguiri, mas os ensaios cometa com células do fígado ($p=0,9476$) e com células do rim ($p=0,284$) não apresentaram diferença entre os pontos de coleta (Figura 13).

FIGURA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRÔNÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE OS LOCAIS DE COLETA - COLETA 3 (FEV/06 E ABR/06) BIOMONITOR: AS DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* († $p < 0,05$)



Quando trabalhamos com as coletas reunidas por localidade, analisamos os dados referentes a 62 lambaris pertencentes à espécie *Astyanax sp B* (34 coletados no Parque Costa e 28 na Fazenda Canguiri) e 52 lambaris da espécie *A. altiparanae* (18 provenientes do Parque Costa e 34 da Fazenda Canguiri). Nas análises dos indivíduos da espécie *Astyanax sp B*, verificamos que todos os biomarcadores detectaram diferenças entre os locais de coleta, e nas análises dos indivíduos *A. altiparanae*, somente o teste do micronúcleo não detectou diferença entre os locais de coleta. Nestas análises, portanto, trabalhamos com um número elevado de indivíduos, o que vem a ser adequado para análises ambientais, já que os indivíduos podem apresentar grandes variações inter e intra-individuais. Essas variações são muito comuns e acabam influenciando muito na análise quando o número de indivíduos analisados é reduzido. Dessa forma, quando os dados foram trabalhados separados por coletas, o número amostral foi reduzido, o que pode ter comprometido a precisão dos testes estatísticos. Da mesma forma,

quando analisamos os resultados separando as coletas, nas coletas 2 e 3 tivemos que reunir os dados referentes às duas espécies, o que também pode ter reduzido a sensibilidade do teste estatístico, caso as duas espécies apresentem diferenças de respostas. Na coleta 2, trabalhando com 40 lambaris (17 do Parque Costa e 23 da Fazenda Cangüiri) somente o teste do micronúcleo píceo não detectou diferença entre os locais de coleta, porém isso pode ser explicado devido à já citada menor sensibilidade desse teste e na coleta 3, trabalhando com 41 lambaris (23 do Parque Costa e 18 da Fazenda Cangüiri em Fev/06 e Abr/06, respectivamente), não foi observada diferença significativa entre os dois locais quando se utilizaram dados dos ensaios cometas das células de fígado e de rim.

Esses resultados observados podem sugerir que na Fazenda Cangüiri a contaminação esteja diminuindo de forma gradual, já que os tecidos hepático e renal foram apresentando menores índices de danos no decorrer das coletas, bem como também podem sugerir que a contaminação no Parque Costa possa estar aumentando no decorrer do período amostral, o que também acarretaria na não detecção de diferença entre os locais quando se analisou ensaio cometa com células de fígado e rim.

Da mesma forma que ocorreu quando avaliamos as coletas de forma reunida, agora quando analisamos as coletas separadamente, através de diversos biomarcadores empregados, verificamos elevada taxa de alteração no DNA dos peixes coletados na Fazenda Cangüiri, evidenciando uma contaminação do local, possivelmente devido à utilização de agrotóxicos. Sugerimos uma continuidade dos estudos nesta área, para verificar o comportamento das células do sangue e dos tecidos, segundo os testes do micronúcleo e cometa, ainda por alguns anos a fim de verificar uma possível e progressiva descontaminação da área.

Devido à dificuldade de mensurar todos os tipos de químicos em ambientes aquáticos, o uso de bioindicadores para medir os níveis de poluição é muito importante (RANK; JENSEN; JESPERSEN, 2005). Mesmo os testes de genotoxicidade evidenciando contaminação por resíduos genotóxicos como metais pesados, compostos clorados e outros compostos orgânicos, supostamente utilizados na região da Fazenda Cangüiri, a pesquisa de outros biomarcadores,

como a medição da atividade da enzima acetilcolinesterase em músculo de peixes, que evidencia contaminação por pesticidas, especialmente carbamatos e organofosforados (MONSERRAT; YUNES; BIANCHINI, 2001) também pode ser recomendada para a área. Além disso, também pode-se recomendar análises da concentração de pesticidas na água da represa da Fazenda Cangüiri. Apesar do elevado custo destas análises, devido ao elevado nível de precisão exigida (em níveis de ppb – partículas por bilhão), essa análise indicaria, com precisão, qual a origem da contaminação, já evidenciada através dos biomarcadores de contaminação ambiental, como os apresentados nesse trabalho.

5.1.4 Comparação entre as diferentes épocas de coleta

É também de se considerar que animais pecilotérmicos, tais como os peixes, a taxa metabólica é uma consequência direta da temperatura ambiental. Dessa forma, é conhecido que flutuações na temperatura ambiental podem resultar em algumas respostas celulares induzidas por estresse. Exposição de células ou organismos a um estresse térmico pode resultar em alterações na integridade do nucléolo bem como efeitos adversos na estrutura e funcionamento do centrômero dos cromossomos (BUSCHINI et al., 2003). Um retardo na progressão do ciclo celular e a incapacidade de células de entrarem em mitose são processos que também já foram observados (YANG; TAKAHASHI, 1999).

Variabilidade sazonal tem sido largamente referenciada em estudos de monitoramento e a temperatura é um dos fatores associados com essa variabilidade. São necessárias, entretanto, mais investigações dos efeitos da temperatura nos níveis de danos ao DNA. BENINCÁ (2006) observou maior dano em peixes coletados durante o período de inverno.

Os níveis de precipitação observados nas épocas das coletas também podem ser determinantes, pois o excesso de chuvas pode ocasionar carreamento de poluentes aos rios e lagos. Segundo RANK, JENSEN e JESPERSEN (2005) condições do tempo, como tempestades, podem causar turbulência dos sedimentos e transporte de poluentes para locais distantes de seu local de origem.

A sedimentação primária ou os movimentos de sedimentos são fatores muito difíceis de serem avaliados, mas que podem influenciar os níveis de poluição. A seguir, estão apresentados os resultados referentes às coletas realizadas nos dois locais separadamente.

5.1.4.1 Coletas na Fazenda Cangüiri

Desconsiderando as espécies, também foram realizadas comparações entre os períodos de coletas.

Para se verificar se houve diferença entre as coletas deve-se observamos o valor de p fornecido pelo teste de Kruskal-Wallis entre as coletas comparadas duas a duas, sendo o nível de significância de 0,05. Para verificar qual coleta apresentou maior grau de dano observamos o valor do posto médio (R) de cada uma das coletas, valor esse também fornecido pelo próprio teste estatístico.

O teste do micronúcleo písceo realizado nos lambaris coletados na Fazenda Cangüiri, não detectou diferença entre as coletas 1 (Abr/05) e 3 (Abr/06) ($p=0,2574$). Ao comparar as coletas 1 e 2 (Nov/05), o valor de p observado foi de 0,0609 valor esse que reflete não haver diferença entre as coletas, porém pode ser um indicativo de que exista diferença entre essas coletas (valor muito próximo do limiar de significância). Ao comparar as coletas 2 e 3 observou-se diferença significativa ($p=0,0031$) e maior contaminação na coleta 3 (Abr/06) do que na coleta 2 sendo que o valor do posto médio (R) foi 23,1739 na coleta 2 e enquanto que na coleta 3 esse valor foi de 39,9444. Dessa forma, utilizando o teste do micronúcleo písceo pode-se estabelecer uma relação entre as coletas da Fazenda Cangüiri como: coleta1 ~ coleta 3 > coleta 2.

No ensaio cometa com eritrócitos realizado com os lambaris coletados na Fazenda Cangüiri, observou-se diferença entre todas as coletas, sendo entre as coletas 1 e 2, $p=0,0063$ e $p=0$ entre as coletas 1 (Abr/05) e 3 (Abr/06) e entre 2 (Nov/05) e 3. A coleta 1 foi a que apresentou maior dano ($R_1= 48,1905$), seguido pela coleta 2 ($R_2=33,3043$) e finalmente pela coleta 3 ($R_3=9,7222$), esta com

menor dano. Nesse ensaio, a relação estabelecida entre as coletas é a seguinte: coleta 1 > coleta 2 > coleta 3.

O ensaio cometa com células de fígado dos lambaris coletados na Fazenda Cangüiri, mostrou diferença da coleta 2 para as demais sendo $p=0$ ao comparar esta com a coleta 1 e com a coleta 3. Não foi verificada diferença entre as coletas 1 e 3 (Abr/05 e Abr/06; $p=0,2907$) e, ao se observar o valor do posto médio fornecido pelo teste de Kruskal-Wallis, verificou-se maior dano na coleta 2 (Nov/05; $R_2=46,6739$). Dessa forma, a relação entre o dano observado nas coletas realizadas na Fazenda Cangüiri, ao utilizar o ensaio cometa com células de fígado foi: coleta 2 > coleta 1 ~ coleta 3. No ensaio cometa com tecido renal verificou-se também menores danos na coleta 3 ($R_3=18,3056$) do que nas outras duas (sendo $R_1=24,4$ e $R_2=46,6739$).

Ao analisar esses resultados referentes às coletas da Fazenda Cangüiri, verificamos que os dados das coletas 1 e 3 foram quase sempre semelhantes. As épocas nas quais essas coletas foram realizadas (abril de 2005 e abril de 2006) apresentam condições climáticas semelhantes, com temperaturas elevadas e baixos índices de precipitação, enquanto que na coleta 2, em novembro, o índice pluviométrico observado é maior. Quando analisamos o ensaio cometa com tecido hepático, verificamos maiores danos na coleta 2, fazendo com que possamos sugerir que com índices pluviométricos elevados, maiores também são os danos ao DNA (especificamente no fígado), possivelmente pelo carreamento de poluentes genotóxicos aos lagos. Desse modo, esse teste pode estar evidenciando alguma contaminação aguda no local logo após os períodos de chuva. A Tabela 03 apresenta os índices pluviométricos mensais observados na cidade de Curitiba, no período de 2001 a 2003.

TABELA 03 – PRECIPITAÇÃO MÉDIA MENSAL (EM MM) PARA A ESTAÇÃO PLUVIOMÉTRICA PIRAQUARA – PR, NO PERÍODO DE 2001 A 2003

Anos	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez
2001	72,5	174,8	166,9	72,5	149,6	151,8	174,2	56,4	58,8	164,4	140,2	136,6
2002	229,9	141,2	100,9	56,1	99,3	44,5	39,0	72,8	159,3	138,5	115,4	110,7
2003	12,7	210,7	40,8	78,3	20,0	76,6	143,8	15,3	160,7	42,3	136,9	145,4
Média	105,0	175,6	102,9	69,0	89,6	91,0	119,0	48,2	126,3	138,9	130,8	130,0

FONTE: Modificado de XAVIER, 2005

Os micropoluentes orgânicos, também chamados de POPs (Poluentes Orgânicos Persistentes) incluem, entre outras moléculas, os inseticidas organoclorados. Os POPs são bastante importantes em estudos ecotoxicológicos, podendo ser encontrados nas partes mais remotas do planeta (tanto em solos, como na água e no ar), até mesmo em áreas de pouca ou nenhuma utilização destes. Esse fato se deve às suas características físico-químicas que favorecem processos de persistência, biomagnificação e grande transporte atmosférico. Os processos de biomagnificação e bioacumulação ocorrem devido às suas características lipofílicas, que faz com que esses compostos se integrem aos organismos e às cadeias tróficas (SANTOS et al., 2004; HERMANN; FILLMANN, 2004).

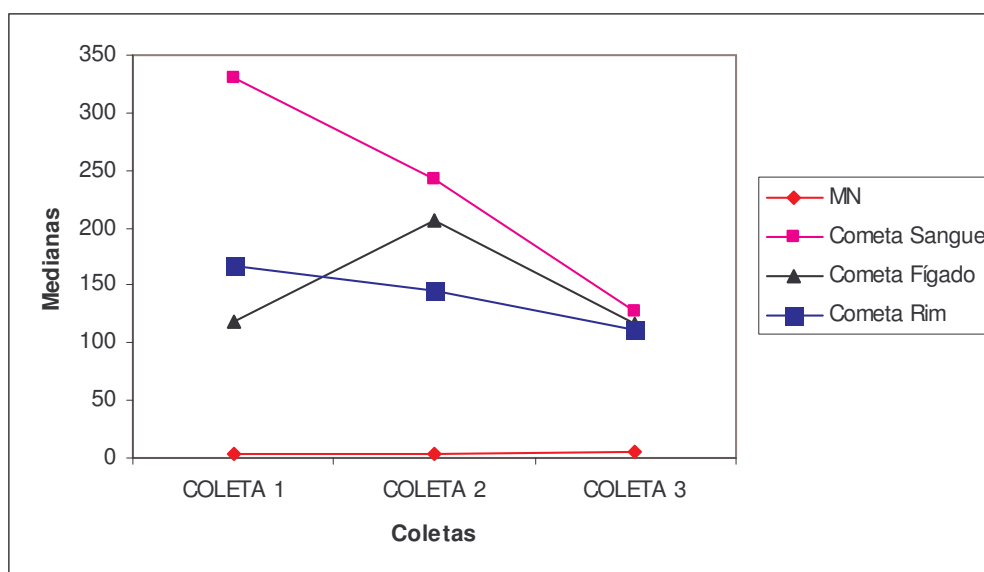
Com relação aos ensaios cometa realizados, podemos deduzir que tanto para eritrócitos quanto para tecido renal houve uma diminuição do grau de lesão da primeira para a terceira coleta. Esse fato foi de acordo com o esperado, uma vez que toda e qualquer atividade agropecuária com xenobiontes na Fazenda Experimental do Cangüiri está suspensa desde 2001 e a tendência é para que ocorra redução na concentração destes agentes com o passar dos anos. A Tabela 04 apresenta as medianas de danos impostos ao material genético utilizando os quatro biomarcadores: teste do micronúcleo píficeo, ensaio cometa com sangue, com células do tecido hepático e com células do tecido renal dos peixes coletados na Fazenda Cangüiri (Abr/05, Nov/05 e Abr/06) (Figura 14).

TABELA 04 – MEDIANAS ENCONTRADAS ATRAVÉS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES NOS PEIXES COLETADOS NA FAZENDA CANGUIRI (ABR/05, NOV/05, ABR/06)

COLETAS	NÚMERO DE MN E ALTERAÇÕES	ESCORES ENSAIO COMETA SANGUE	ESCORES	ESCORES
			ENSAIO COMETA FÍGADO	ENSAIO COMETA RIM
1	4	330	118	167
2	3	242	207	145
3	5	127,5	116,5	112

NOTA: épocas das coletas: coleta 1 - abril de 2005; coleta 2 - novembro de 2005 e coleta 3 - abril de 2006.

FIGURA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIO COMETA COM CÉLULAS DE SANGUE, DE FÍGADO E DE RIM) NAS COLETAS REALIZADAS NA FAZENDA CANGUIRI, DESCONSIDERANDO AS ESPÉCIES



5.1.4.2 Coletas no Parque Ecológico Costa

Da mesma forma que nas análises realizadas com o material das coletas na Fazenda Cangüiri, para a análise dos dados observados nas coletas do Parque Costa, os peixes também foram considerados como da mesma espécie. As

comparações foram feitas entre os períodos de coletas, através do teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Para verificar se houve diferença entre as coletas observamos o valor de p entre as coletas comparadas duas a duas e, para verificar qual coleta apresentou maiores danos observamos o valor do posto médio (R) de cada uma das coletas, valores estes fornecidos pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis.

O teste do micronúcleo písceo realizado em lambaris coletados no Parque Costa não detectou diferença entre as coletas, com $p=0,6321$ entre as coletas.

No ensaio cometa com sangue observou-se diferença ($p=0,0011$) entre as coletas 1 (Fev/05) e 2 (Out/05) e entre as coletas 1 e 3 ($p=0,0006$) (Fev/06). Não foi observada diferença entre as coletas 2 e 3 ($p=0,9693$). Analisando o valor do posto médio (R) na coleta 1, verificamos que esta apresentou menores danos ($R_1=12,25$) enquanto que as coletas 2 e 3 apresentaram $R_2=30,88$ e $R_3=30,69$, respectivamente. Assim, a relação observada entre as coletas realizadas no Parque Costa usando o biomarcador cometa com sangue foi: coleta 2 ~ coleta 3 > coleta 1.

No ensaio cometa realizado com tecido hepático dos lambaris coletados no Parque Costa, foi verificada diferença entre todas as coletas, com $p=0,0102$ entre as coletas 1 e 2; $p=0$ entre as coletas 1 e 3 e $p=0,031$ entre as coletas 2 e 3. E, ao observarmos o valor de R_1 (posto médio da coleta 1) verificamos que este foi 10,5833 enquanto que $R_2=25,2647$ e $R_3=35,7174$, mostrando dessa forma a coleta 1 foi a coleta com menor índice de dano, seguido da 2 e depois pela coleta 3, sendo essa com maiores danos. A relação entre as coletas, utilizando esse biomarcador foi: coleta 3 > coleta 2 > coleta 1.

No ensaio cometa com células de tecido renal, ao comparar as coleta 1 e 2, não foi verificada diferença ($p=0,1519$) enquanto que entre as coletas 1 e 3 e entre as coletas 2 e 3 podemos verificar diferenças entre elas, sendo $p=0,0001$ e $p=0,0098$, respectivamente. Ao analisarmos os valores de R (posto médio) verificamos que a coleta 3 teve maior dano e que a coleta 1 teve o menor dano, sendo $R_1=14,6667$, $R_2=22,8529$ e $R_3=35,3696$. Sendo assim, a relação

estabelecida entre as coletas, usando o biomarcador ensaio cometa com células do tecido renal, foi: coleta 3 > coleta 1 ~ coleta 2.

Podemos verificar através dos ensaios cometa realizados com células de sangue, de fígado e de rim que a coleta 1 foi a que apresentou os menores índices de dano. Nesse caso, os índices médios pluviométricos nos meses de fevereiro e outubro (Tabela 03) são semelhantes, não sendo uma justificativa que possa explicar o aumento gradual dos danos que foram observados. Assim, podemos sugerir que houve algum evento de contaminação no Parque Costa no decorrer do período.

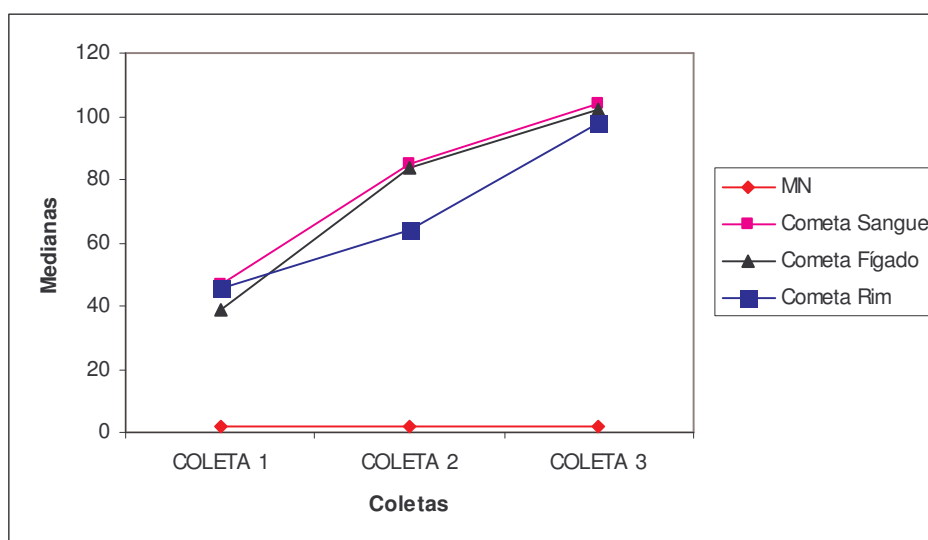
A Tabela 05 apresenta as medianas de danos impostos ao material genético utilizando os quatro biomarcadores: teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa com sangue, com células do tecido hepático e com células do tecido renal dos peixes coletados no Parque Costa (Fev/05, Out/05 e Fev/06) (Figura 15).

TABELA 05 – MEDIANAS ENCONTRADAS ATRAVÉS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES NOS PEIXES COLETADOS NO PARQUE COSTA (FEV/05, OUT/05, FEV/06)

COLETAS	MNE			
	ALTERAÇÕES	COMETA SANGUE	COMETA FÍGADO	COMETA RIM
1	2	47	39	45,5
2	2	85	84	64
3	2	104	102	98

NOTAS: épocas das coletas: coleta 1 - fevereiro de 2005; coleta 2 - outubro de 2005 e coleta 3 - fevereiro de 2006.

FIGURA 15 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIO COMETA COM SANGUE E TECIDOS HEPÁTICO E RENAL) NAS COLETAS REALIZADAS NO PARQUE COSTA, DESCONSIDERANDO AS ESPÉCIES



Ao comparar as respostas dos diferentes biomarcadores, podemos deduzir que a contaminação na Fazenda Cangüiri encontrou-se diminuída, enquanto que no Parque Costa a contaminação encontrou-se aumentada no decorrer desse trabalho.

No caso da Fazenda Cangüiri, a diminuição no grau de dano detectada, pode ser devido ao fato da Fazenda se encontrar desativada desde 2001 e, portanto, sem nenhuma atividade agropecuária desenvolvida desde então. Pode-se presumir, dessa forma, que as águas da lagoa estão sendo restauradas. O efeito contrário foi verificado no Parque Costa, que teve aumentado o dano. Isso pode ser resultado da entrada de água contaminada proveniente do Rio Iguazu na lagoa do Parque ou devido às intensas chuvas que carregam contaminantes aéreos para dentro das lagoas, sendo esta a causa tida como a mais provável, tendo em vista que este parque está localizado em uma área bastante industrializada de Curitiba e a lagoa utilizada em nosso trabalho tida como sem contato com as águas do Rio Iguazu.

5.1.5 Comparação de respostas entre as duas espécies

A comparação entre as duas espécies foi possível de ser feita na terceira coleta em ambos os locais: Parque Costa (Fev/06) e Fazenda Cangüiri (Abr/06). Esta comparação foi realizada para todos os biomarcadores através do teste estatístico de Mann-Whitney. Essa terceira coleta foi a única que possibilitou essa análise, tendo em vista a frequência proporcional de exemplares de cada uma das espécies em cada um dos locais de coleta.

Dessa forma, para analisarmos se houve diferença entre as espécies, trabalhamos com 23 exemplares de *Astyanax sp B* (sendo 13 no Parque Costa e 10 na Fazenda Cangüiri) e 18 de *Astyanax altiparanae* (sendo 10 no Parque Costa e 08 na Fazenda Cangüiri).

No teste do micronúcleo písceo os dados observados nos exemplares coletados na Fazenda Cangüiri mostraram diferença de resposta entre as espécies ($p=0,0263$), tendo a espécie *Astyanax sp B* apresentado maior grau de lesão em relação à *A. altiparanae*. Podemos deduzir pelo teste do micronúcleo písceo que *Astyanax sp B* se mostrou mais sensível à ação dos contaminantes presentes na água do lago da Fazenda Cangüiri do que *A. altiparanae*. Nos indivíduos coletados no Parque Costa, não foi detectada diferença de resposta entre as duas espécies ($p=0,765$).

No ensaio cometa com sangue, os dados obtidos dos animais coletados na Fazenda Cangüiri não detectaram diferença de resposta entre as duas espécies ($p=0,1002$), porém o ensaio realizado nos animais coletados no Parque Costa, mostrou diferença significativa entre as espécies, tendo *Astyanax altiparanae* apresentado maior lesão ($p=0,0508$). Porém, o subdimensionamento amostral pode ter comprometido a precisão do teste estatístico.

O ensaio cometa com tecido hepático mostrou que a espécie *Astyanax altiparanae*, coletada na Fazenda Cangüiri, apresentou maior dano (com $p=0,0067$), sendo que, de forma contrária, nos animais coletados no Parque Costa, não foi observada diferença de resposta entre as espécies ($p=0,468$).

No ensaio cometa com tecido renal, foi detectado maior grau de dano nos indivíduos da espécie *A. altiparanae* (com $p=0,082$) nos animais coletados no Parque Costa, enquanto que os peixes coletados na Fazenda Cangüiri não apresentaram diferença significativa entre as respostas das duas espécies ($p=0,8940$).

De uma maneira geral, alguns biomarcadores em alguns dos locais não mostravam diferenças de respostas entre as espécies, e os resultados que mostravam diferenças apresentaram valores de p muito próximos do limite de significância. Assim, como a grande limitação deste trabalho foi encontrar um número suficiente de animais de cada uma das espécies nos dois locais de coleta, podemos questionar se o número de indivíduos utilizados nessa análise foi adequado, podendo as variações inter e intra-individuais ter originado essa diferença de resposta entre as espécies. Sendo assim, verificou-se a necessidade de complementar os dados obtidos no biomonitoramento com os dados de um bioensaio, com um número elevado de exemplares e com condições mais homogêneas do que as observadas no campo. Esse bioensaio pode fornecer resultados mais confiáveis no que diz respeito em relação à resposta diferenciada das duas espécies.

As Figuras 16 e 17 mostram a comparação entre as espécies *Astyanax altiparanae* e *Astyanax sp B* coletados na Fazenda Cangüiri e no Parque Costa, respectivamente.

FIGURA 16 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIO COMETA COM CÉLULAS DE SANGUE, DE FÍGADO E DE RIM) ENTRE AS ESPÉCIES *Astyanax altiparanae* e *Astyanax sp B* COLETADOS NA FAZENDA CANGUIRI – ABR/06 († $p < 0,05$)

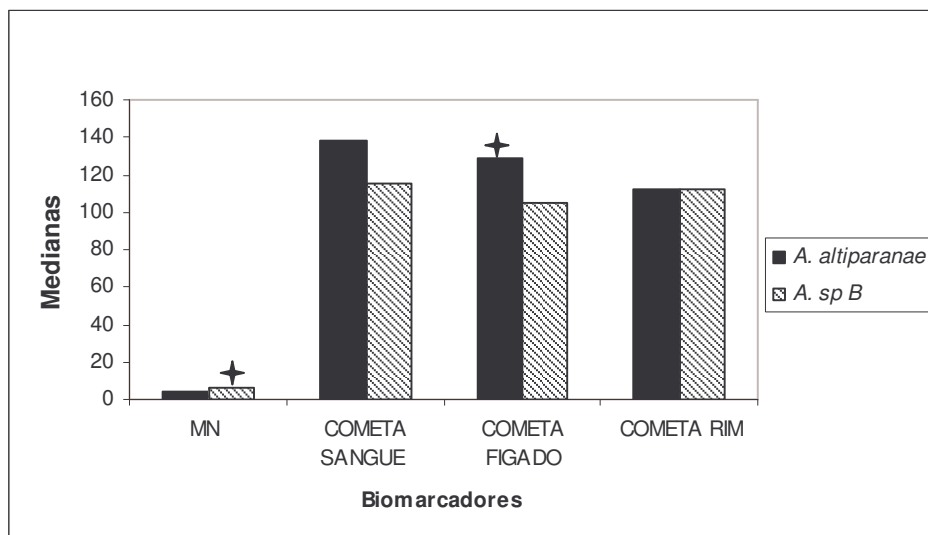
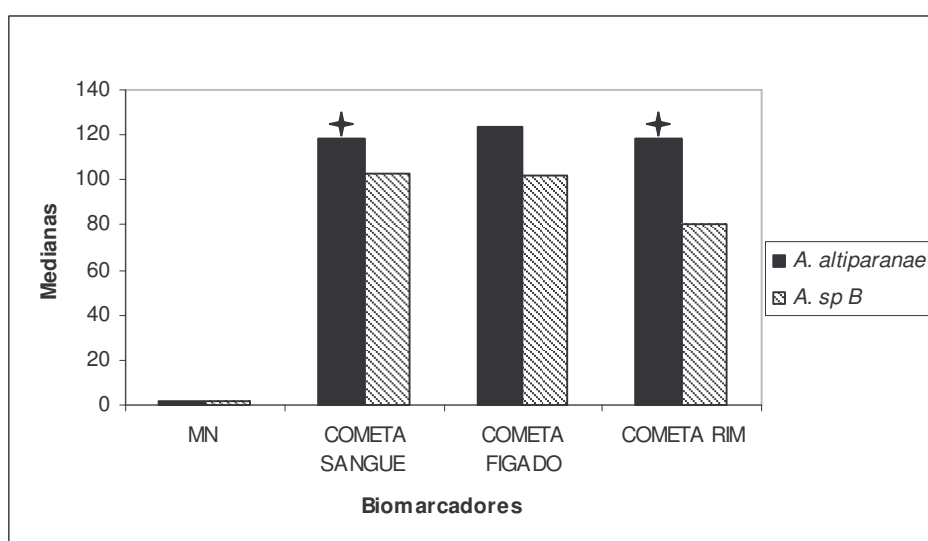


FIGURA 17 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIO COMETA COM CÉLULAS DE SANGUE, DE FÍGADO E DE RIM) ENTRE AS ESPÉCIES *Astyanax altiparanae* e *Astyanax sp B* COLETADOS NO PARQUE COSTA – FEV/06 († $p < 0,05$)



A Figura 18 apresenta núcleos de eritrócitos dos peixes coletados na Fazenda Cangüiri, mostrando algumas alterações morfológicas (b a e) e presença de micronúcleos (f e g) e a Figura 19 apresenta seções de lâminas do ensaio cometa com sangue de lambaris apresentando elevados (a) e baixos (b) índices de danos.

FIGURA 18 – NÚCLEOS DOS ANIMAIS COLETADOS NA FAZENDA CANGÜIRI. OBSERVAM-SE EM: a – NÚCLEO NORMAL; b, c, d E e – NÚCLEOS COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS; f E g – PRESENÇA DE MICRONÚCLEO

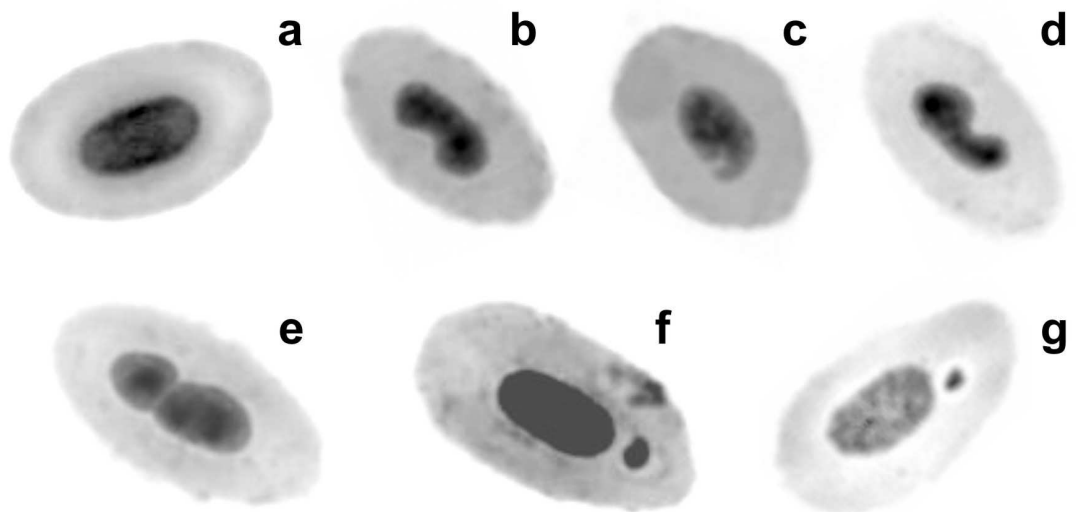
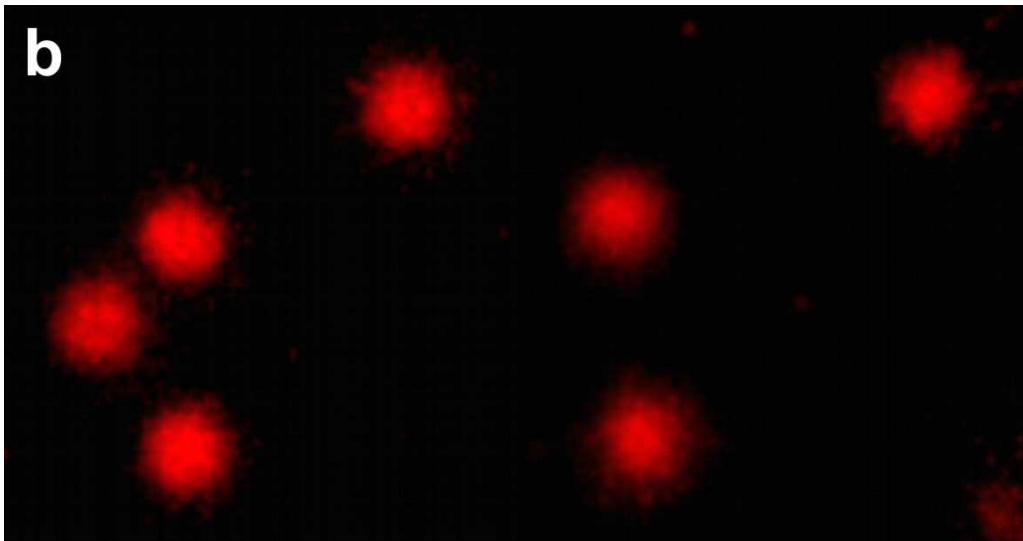
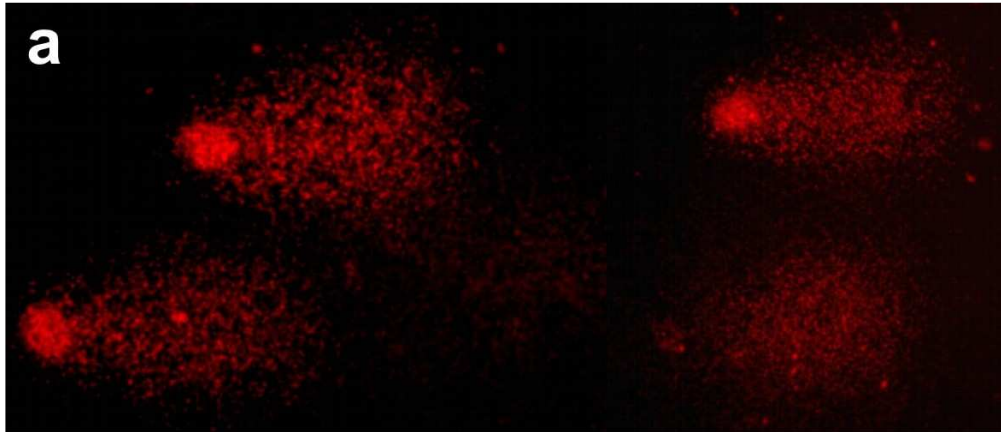


FIGURA 19 – SEÇÕES DE LÂMINAS COM CÉLULAS DE SANGUE SUBMETIDAS AO ENSAIO COMETA, APRESENTANDO (a) ELEVADOS GRAUS DE DANOS E (b) BAIXOS GRAUS DE DANO



5.2 Bioensaio

O uso de bioensaios permite estudar os efeitos tóxicos de determinados contaminantes de forma isolada ou associados, minimizando a influência das variáveis ambientais. Os resultados obtidos através de bioensaios não podem ser transferidos diretamente para o ambiente, mas auxiliam no fornecimento de uma base de dados visando um melhor entendimento dos fatores que estão interferindo na saúde dos organismos e/ou alterando as condições do próprio ambiente.

Para avaliar as diferenças de respostas entre as duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *Astyanax altiparanae*), utilizamos o químico sulfato de cobre em bioensaio. Esse composto vem tendo a sua clastogenicidade testada *in vivo*, porém, os resultados têm se mostrado inconsistentes (BHUNYA; JENA, 1996). Para MATSUI (1980), ele não ocasionou danos ao DNA de procariotos; DE FLORA et al. (1984) reportaram sua propriedade não-mutagênica em diversas linhagens de *S. typhimurium* e o seu resultado negativo nos testes de reparo do DNA com diversas linhagens de *E. coli*; OLIVER e MARZIN (1987), também observaram resultados negativos em bactérias e SANCHEZ-GALAN et al. (2001) não observaram aumento na frequência de micronúcleos em língulas, contaminadas com sulfato de cobre. Entretanto, efeitos clastogênicos *in vivo* foram reportados por BHUNYA e PATI (1987), AGARWAL, SHARMA e TALUKDER (1990) e SINA et al. (1983) em ratos, ROSEN (1964) em plantas e por BHUNYA e JENA (1996) em filhotes de *Gallus domesticus*.

Poucos trabalhos testando a genotoxicidade desse composto foram realizados em peixes, porém, recentemente, CAVAS, GARANKO e ARKHIPCHUK (2005) verificaram em *Cyprinus carpio* e *Carassius gibelio*, que a dose 0,25 mg/L induziu aumento na frequência de micronúcleos em sangue periférico, células de brânquias e de fígado. Diante da inconsistência dos dados observados, da escassez de trabalhos visando determinar a toxicidade desse composto em peixes e comparar as duas respostas de *Astyanax* no presente estudo, o bioensaio foi realizado.

O sulfato de cobre é freqüentemente usado na aqüicultura para reduzir a quantidade de fitoplâncton e controlar a floração de algas (CHEN; LIN, 2001). A aplicação de cobre varia de 0,025 a 2 mg/L, resultando em acúmulo do excesso do íon cobre e subsequente toxicidade, o que reduz o crescimento, a reprodução e a alimentação dos organismos expostos (BOYD, 1990). Além disso, pode ser letal aos peixes por desencadear um processo de coagulação do muco branquial e conseqüentemente a asfixia (LINDER, 2001). Doses elevadas de cobre são extremamente nocivas, pois é facilmente bioconcentrado nas brânquias, fígado, rins, tecidos adiposos e na musculatura dos organismos aquáticos, comprometendo-os para o consumo humano (LUCARELLI, 2006).

Quando a habilidade de estocar o cobre é excedida, a concentração liberada (não estocada) pode gerar ERO (espécies reativas de oxigênio). Assim, o cobre pode contribuir para a formação de radicais livres (pró-oxidante) ou ainda para a resistência contra a formação do estresse oxidativo (antioxidante) (LINDER, 2001). Excesso deste metal na dieta desencadeia a primeira ação tóxica que é a formação de radicais livres no tecido onde o cobre se acumulou. O fígado é o principal órgão envolvido na homeostase do cobre e acumula uma grande proporção deste elemento absorvido dos alimentos ou água. O principal órgão de excreção do excesso de cobre em peixes teleósteos é a bile (GROSELL; JENSEN, 2000). As brânquias de peixes também estão implicadas na excreção de cobre (HANDY, 1996), mas esse processo ainda não está bem definido.

5.2.1 Comparação entre os grupos controle e tratados com sulfato de cobre

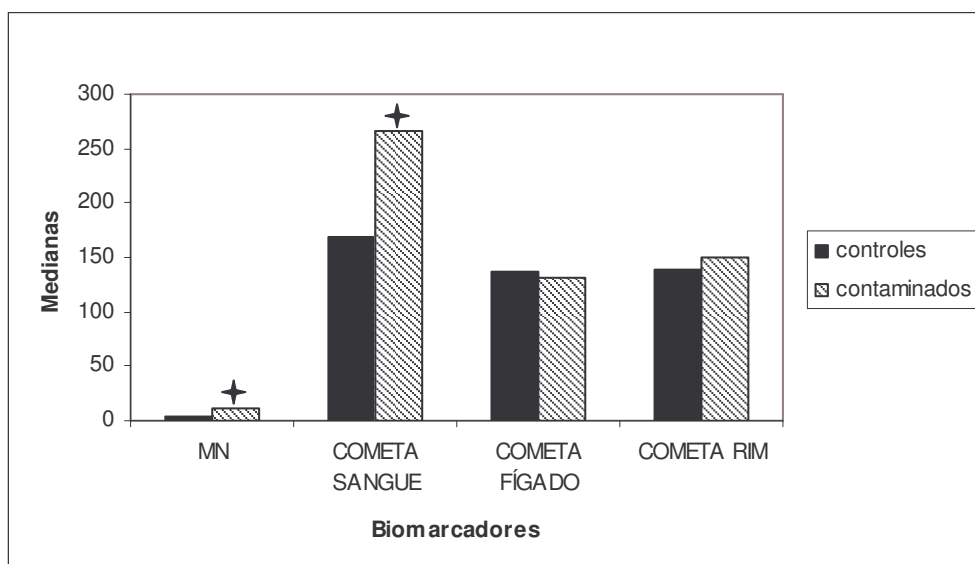
Foram utilizados para a realização do bioensaio 75 lambaris, sendo 36 pertencentes à espécie *Astyanax sp B* (18 contaminados e 18 controles) e 39 *A. altiparanae* (20 contaminados e 19 controles). Os lambaris, tanto os controles como os do grupo contaminado, foram mantidos em aquários de 18 litros, com quatro animais por aquário, sendo que os contaminados ficaram expostos à contaminação por sulfato de cobre (0,25mg/L) por 72 horas. Também foram analisados sangue pelo teste do micronúcleo písceo e ensaio cometa e células do

fígado e do rim pelo ensaio cometa. Os resultados observados para *Astyanax sp B* estão apresentados no Apêndice 07 e para *Astyanax altiparanae* no Apêndice 08.

Com a espécie *Astyanax sp B*, o teste do micronúcleo písceo mostrou diferença significativa entre os grupos controle e tratado, sendo $p=0,004$. O ensaio cometa com sangue também indicou a presença de contaminação ($p=0$). Esses resultados mostram que o sangue é capaz de refletir as diferenças entre os grupos controles e tratados com sulfato de cobre na concentração de 0,25 mg/L, tanto no teste do micronúcleo písceo quanto no ensaio cometa com eritrócitos. Esses resultados concordam com CAVAS, GARANKO e ARKHIPCHUK (2005) que verificaram em *Cyprinus carpio* e *Carassius gibelio*, que a dose 0,25 mg/L induziu aumento na frequência de micronúcleos em sangue periférico.

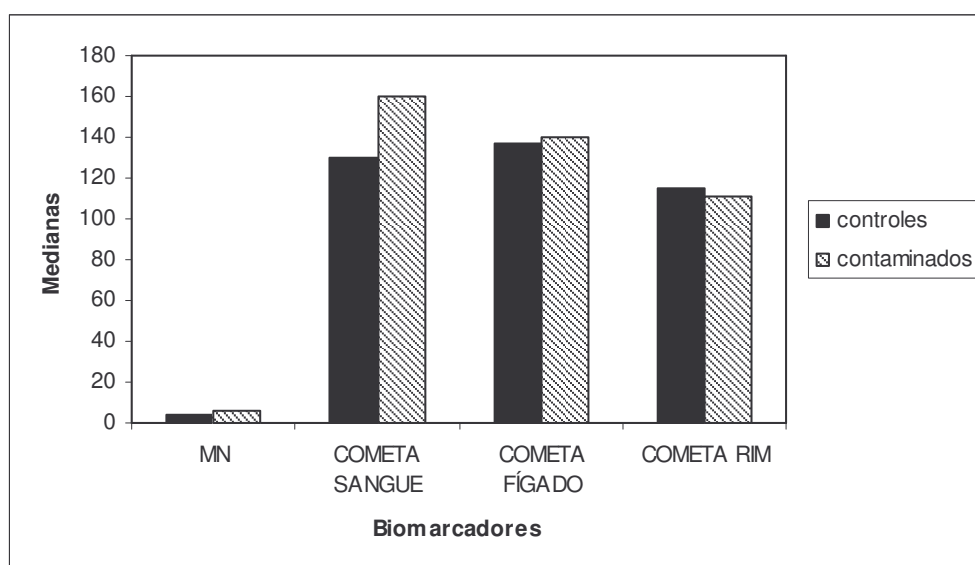
Os resultados obtidos nos ensaios cometa com as células do fígado ($p=0,2482$) e do rim ($p=0,2614$) em *Astyanax sp B* não demonstraram diferença significativa entre os grupos controle e tratado. Esses resultados podem ser decorrentes do curto tempo de exposição ao qual os indivíduos contaminados ficaram expostos ao xenobionte, insuficiente para originar danos aos tecidos e originando somente danos às células circulantes ou em função deste agente mutagênico atingir preferencialmente células sangüíneas por alguma razão específica do seu metabolismo (Figura 20).

FIGURA 20 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE INDIVÍDUOS CONTROLES E CONTAMINADOS DE *Astyanax sp B* (✦ $p < 0,05$)



Ao analisar a espécie *Astyanax altiparanae*, o teste do micronúcleo písceo ($p=0,0918$) e os ensaios cometas com sangue ($p= 0,1189$), fígado ($p=1$) e rim ($p=0,8441$) não detectaram diferença entre os grupos controle e contaminado. Esses resultados observados, especialmente com sangue, sugerem que a espécie *Astyanax altiparanae* é resistente ao químico sulfato de cobre na concentração de 0,25 mg/L (Figura 21), diferente do que foi observado na espécie *Astyanax sp B*.

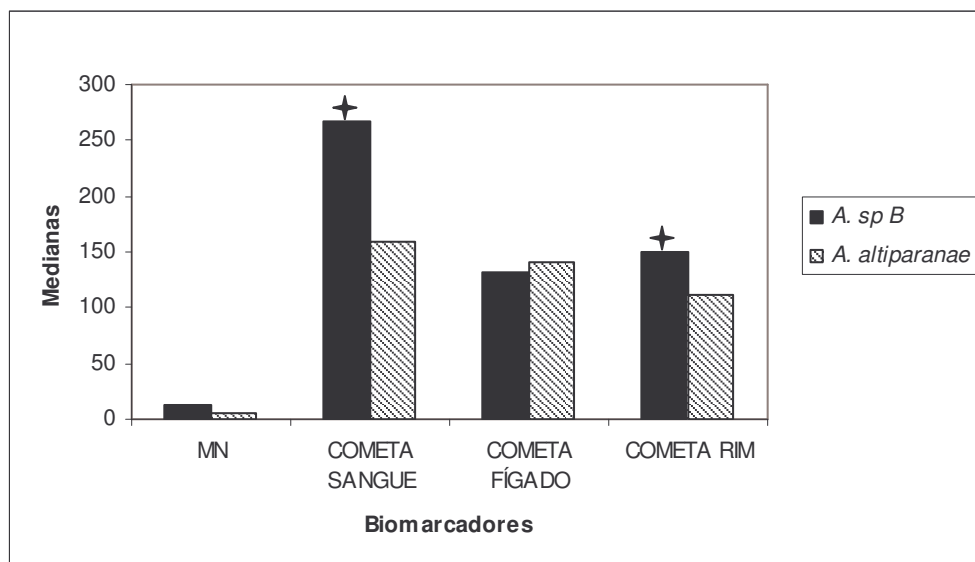
FIGURA 21 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DIFERENTES BIOMARCADORES (TESTE DO MICRÔNÚCLEO PÍSCEO, ENSAIOS COMETA COM CÉLULAS DO SANGUE, FÍGADO E RIM) ENTRE INDIVÍDUOS CONTROLES E CONTAMINADOS DE *Astyanax altiparanae* (\dagger $p < 0,05$)



5.2.2 Comparação entre espécies

Ao realizar a análise estatística para comparação entre as respostas das duas espécies frente ao sulfato de cobre (0,25 mg/L), verificamos que o teste de micronúcleo písceo ($p = 0,0555$) e no ensaio cometa de células do fígado não foi observada diferença de resposta entre as duas espécies ($p = 0,4738$). Entretanto, no ensaio cometa com sangue ($p = 0$) e com células do rim ($p = 0,0021$) observou-se diferença de resposta entre as duas espécies sendo a espécie *Astyanax sp B* mais sensível que *A. altiparanae*. Esses resultados sugerem que a espécie *Astyanax sp B* seja mais sensível frente à concentração de sulfato de cobre utilizada no presente trabalho (Figura 22).

FIGURA 22 – COMPARAÇÃO ENTRE ESPÉCIES (*Astyanax sp B* e *Astyanax altiparanae*) NOS INDIVÍDUOS CONTAMINADOS COM SULFATO DE COBRE (0,25 mg/L) POR 72 HORAS († p<0,05)



O ensaio cometa com sangue demonstrou que existe diferença de resposta entre as espécies, sendo a espécie *Astyanax sp B* mais sensível à presença do contaminante, sulfato de cobre, na água. Essa diferença foi também observada no ensaio cometa com células do tecido renal, que é o tecido hematopoiético dos peixes.

Dessa forma, recomenda-se o uso da espécie *Astyanax sp B* como biomonitor em análises ambientais, devido à sua maior resposta frente aos contaminantes, tanto em situação de campo quanto em bioensaio. Esse uso também deve ser justificado pela abundância dessa espécie nos ecossistemas de água doce e também pela maior facilidade de manutenção desta espécie em laboratório, quando comparada à espécie *Astyanax altiparanae*.

Como as duas espécies estudadas foram simpátricas para os dois locais de coleta, provavelmente elas possuem hábitos alimentares e comportamentais diferentes. Sugere-se, dessa forma, que sejam feitos mais estudos sobre o comportamento exploratório das duas espécies, que pode revelar taxas diferenciadas de metabolismos, seus conteúdos estomacais, que poderá também

revelar dietas diferenciadas quando esses animais se encontram no ambiente. Investigações adicionais sobre a sensibilidade de organismos aquáticos a contaminantes ambientais deverão ser realizadas utilizando-se espécies comuns aos ecossistemas brasileiros.

6. CONCLUSÕES

Na Fazenda Cangüiri, foram observados maiores graus de contaminação nas coletas realizadas em abril de 2005 e abril de 2006; tendo a Fazenda Cangüiri mostrado uma diminuição no índice de contaminação no decorrer das análises, possivelmente devido à suspensão do uso de agrotóxicos desde 2001,

O Parque Ecológico Costa, no decorrer do trabalho, mostrou aumento de contaminação, possivelmente pela deposição e carreamento de contaminantes aéreos da região;

Utilizando a espécie *Astyanax sp B*, todos os biomarcadores indicaram a Fazenda Experimental Cangüiri com maiores índices de danos, indicando maior contaminação quando comparado com o Parque Ecológico Costa;

Utilizando a espécie *Astyanax altiparanae* os ensaios cometa realizados com sangue, células de rim e células de fígado detectaram diferença entre os locais, com os animais coletados na Fazenda Cangüiri apresentando maior grau de dano;

As duas espécies de lambaris empregadas neste estudo podem ser utilizadas em biomonitoramento, com *Astyanax sp B* mostrando-se mais sensível que *A. altiparanae*;

Na espécie *Astyanax sp B*, o sulfato de cobre (0,25 mg/L - 72 horas) apresentou atividade genotóxica nos testes de micronúcleo písceo e ensaio cometa com sangue, não atingindo os tecidos hepático e renal em decorrência do curto período de exposição ou de ligação específica do cobre ao sangue desta espécie;

Na espécie *Astyanax altiparanae*, o sulfato de cobre (0,25 mg/L - 72 horas) não apresentou atividade genotóxica em nenhum dos tecidos pesquisados;

No bioensaio, *Astyanax sp B* se mostrou mais sensível que *A. altiparanae*, pois ao comparar as espécies, os ensaios cometa com sangue e tecido renal apresentaram diferenças entre as respostas das duas espécies.

A espécie *Astyanax sp B*, fica validada como biomonitor recomendado, tendo em vista sua resposta nos biomarcadores em bioensaio e em campo, por sua abundância nos ecossistemas de água doce brasileiros e pela facilidade de manutenção em laboratórios;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, K.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Clastogenic effects of copper sulphate on the bone marrow chromosomes of mice in vivo. **Mutation Research**, v. 243, p. 1-6, 1990.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997.

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JÚNIOR, H. F. Ameaça ecológica: peixes de outras águas. **Ciência Hoje**, v. 21(124), p. 36-44, 1996.

AKCHA, F.; HUBERT, F.V.; PFHOL-LESZKOWICZ, A. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research**, v. 534, p. 21-32, 2003.

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.; FANKO, M.; ANDRIJANIC, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium-induced micronuclei in fish, **J. Appl. Toxicol.**, v. 13 (5), p. 333-336, 1994.

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

AMADO, L.L.; ROSA, C.E.; LEITE, A.M.; MORAES, L.; PIRES, W.V.; PINHO, G.L.L.; MARTINS, C.M.G.; ROBALDO, R.B.; NERY, L.E.M.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, P.E.; GERACITANO, L.A. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 199-206, 2006a.

AMADO, L.L.; ROBALDO, R.B.; GERACITANO, L.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 207-213, 2006b.

ANDRADE, V.M.; FREITAS, T.R.O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v. 560, p.57-67, 2004.

ANDREOLI, C.V.; DALARMI, O.; LARA, A.I.; ANDREOLI, F. N. Limites ao desenvolvimento da região metropolitana de Curitiba impostos pela escassez de água. **Sanare: revista técnica da Sanepar**, v.12, n 12, p. 31-42, 1999.

ANDREOLI, C.V.; CARNEIRO, C (Eds.) **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. Curitiba: SANEPAR, Finep, 2005.

AOYAMA, K.; IWAHORI, K.; MIYATA; N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. **Mutation Research**, v. 538, p.155-162, 2003.

AREAL COSTA. Disponível em <http://www.arealcosta.com.br/meioambiente.html>. Acesso em: 14 jun. 2006.

ARKHIPCHUK, V.V.; GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p.42-52, 2005.

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.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 221-225, 2001.

AZEVEDO-NETO, J.M.; HESS, M.L. Tratamento de águas residuárias. **Separata da Revista DAE**, p. 218, 1970.

BAHARI, I.B.; NOOR, F.M.; DAUD, N.M. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. **Mutation Research**, v. 313, p. 1-5, 1994.

BAINY, A.C.D.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir – São Paulo, Brazil. **Aquatic Toxicology**, v. 44, p. 289-305, 1999.

BANU, B.S.; ISHAQ, M.; DANADEVI, K.; PADMAVATHI, P.; AHUJA, Y.R. DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1931-1936, 2004.

BARROS, M.; SILVA, M.; SOSA, R. **Geo-Goias - 2002**. Disponível em: http://www.agenciaambiental.go.gov.br/geogoiias/indice_inicial.php>. Acesso em: 24 abr. 2005.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415 (3), p. 167-184, 1998.

BENINCÁ, C. **Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho – Jaguaruna (SC) e Santa Marta – Laguna (SC); utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae)**. Dissertação de Mestrado, UFPR, 2006.

BHUNYA, S.P.; JENA, G.B. Clastogenic effects of copper sulphate in chick in vivo test system. **Mutation Research**, v. 367, p. 57-63, 1996.

BHUNYA S.P.; PATI, P.C. Genotoxicity of an inorganic pesticide, copper sulphate in mouse in vivo test system. **Cytologia**, v. 2, p. 801-808, 1987.

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.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Bermington Publishing, Birmingham, AL, p. 482, 1990.

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

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**: (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Brasília: CODEVASF, 1988.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal**: manual de identificação. Brasília: EMBRAPA, 1999.

BROWN, R. E. Significance of trace metals and nitrates in sludge soils. **Journal WPCF**, v. 47, n. 12, p. 2863-2875, 1975.

BUCKUP, P.A. **Sistemática e biogeografia de peixes de riachos**. In: CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R. & P. R. PERES – NETO. Ecologia de Peixes de Riachos. Rio de Janeiro: Série Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, vol. VI, p.91-138, 1999.

BUSCHINI, A.; CARBONI, P.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in hemocytes of *Dreissena polymorpha*. **Mutation Research**, v. 537, p. 81-92, 2003.

CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J.; DULOUT, F.N.; Genotoxicity evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**, v. 438, p. 155-161, 1999.

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.

CAVAS, T.; GARANKO N.N.; ARKHIPCHUK, V.V. Induction of micronuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574, 2005.

CERVI, E. IAP investiga uso indevido de agrotóxico. **Folha do Paraná**, Curitiba, 26 jan. 2001.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A.O.; 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**, v. 27, p. 270-274, 2004.

CHEN, J.C.; LIN, C.H. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 49, p. 55-65, 2001.

CIPRIANO, R.R.; RIBEIRO, C.A.O.; CESTARI, M.M.; FENOCCHIO, A.S. Evaluation of the effects of tributyltin (TBT) on chromosomes of the neotropical fish *Astyanax* sp. (Pisces, Tetraodonidae). **Cytologia**, v. 69, p.187-190, 2004.

COTELLE, S.; FERARD, J.F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p.246-255, 1999.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

DAS, R.K. ; NANDA, N.K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. **Mutation Research**, v. 175, p. 67-71, 1986.

DE FLORA, S.; ZANACCHI, P.; CAMOIRANO, A.; BENNICELLI, C.; BADOLATI, G.S. Genotoxicity activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. **Mutation Research**, v. 133, p. 161-198, 1984.

DE FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazard in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutation Research**, v. 320, p. 285, 1991.

DE FLORA, S.; VIGANO, L.; AGOSTINI, F.D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, v. 319, p. 167-177, 1993.

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

DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYÖRKOS, R. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 19-27, 1995.

DEVAUX, A.; PESONEN, M.; MONOD, G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. **Toxicology In vitro**, v. 11, p. 71-79, 1997.

DEVAUX, A.; FLAMMARION, P.; BERNARDON, V.; GARRIC, J.; MONOD, G. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P450 1A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 257-262, 1998.

DEVENTER, K. Detection of genotóxica effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 6, 1996.

DIXON, D. R.; PRUSKI, A. M.; DIXON, L. R.; JHA, A. N. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v. 17, p. 495-507, 2002.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College), v. 43, n. 3, p. 209-310, 1921. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College), v. 43, n. 4, p. 311-428, 1927. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997.

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

EVANS, H.J. Cytogenet.: Overview. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 340 B, p. 301-323, 1990.

FABACHER, D.L.; BESSER, J.M.; SCHMITT, C.J.; HARAHBARGAR, J.C.; PETERMAN, P.H.; LEBO, J.A. Contaminated sediments from tributaries of the Great Lakes: chemical characterization and carcinogenic effects in Medaka (*Oryzias latipes*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 20, p. 17-34, 1991.

FARAH, M.A.; ATEEQ, B.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 25-29, 2003.

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

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v. 141, p. 1-5, 2004.

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 Micronucleus and Chromosome Aberrations tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, p. 297-353, 1981.

FLAMMARION, P.; DEVAUX, A.; NEHLS, S.; MIGEON, B.; NOURY, P.; GARRIC, J.; Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 145-153, 2002.

FOLMAR, L.C.; GARDNER, G.R.; HICKEY, J.; BONOMELLI, S.; MOODY, T. Serum chemistry and histopathological evaluations of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from Buffalo and Niagara Rivers, New York. **Arch. Environ. Cotam. Toxicol.**, v. 25, p. 298-303, 1993.

FOWLER, H. W. **Os peixes de água doce do Brasil**. Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo, v. 6, p. 1-204, 1948.

FROESE, R.; PAULY, D. **World Wide Web eletronic publication**. FISHBASE. www.fishbase.org, version 12/2004.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Sér Zool**, n. 13, p. 65-88, 2000.

GAUTO, M. A. **Mundo do Químico – Toxicologia dos metais pesados**. Disponível em: <http://www.mundodoquimico.hpg.ig.com.br/>. Acesso em 10 de outubro de 2006.

GERACITANO, L.A.; LUQUET, C.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 263-267, 2004.

GÈRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publ., 1977.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil. Subordem Characidae**. Ed. Franciscana. São Paulo, v. 4, p. 847, 1975.

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.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçú River basin. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 451-453, 2002.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 235-239, 2000.

GROSELL, M.; JENSEN, F. Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish (*Platichthys flesus*). **Aquat. Toxicol.**, v. 50, p. 97-107, 2000.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 183-188, 1999.

HANDY, R. D. Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 107, p. 171-184, 1994.

HANDY, R.D. Dietary exposure to toxic metals in fish. In: Toxicology of Aquatic Pollution. Cambridge University Press. Cambridge – ed. E.W. Taylor, p.29-60, 1996.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, F.; MARTUS, H.J.; FJALLMAN, A.; FRICAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 843-858, 2001.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v. 399 (2), p. 125-133, 1998.

HAZEN, M.J.; JUARANZ, A.; SOEKERT, J.C.; GONZALEZ, A.; BELTAN-PORTER, D. Effect of copper co-ordination complexes on sister chromatid exchanges in plant cells, **Mutation Research**, v. 207, p.135-139, 1988.

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

HERMANNNS, L.; FILLMANN, G. Os organoclorados representam um risco de contaminação á Lagoa dos Patos (RS)? In: Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, VIII, 2004, Florianópolis – SC. **Resumos...** Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, SETAC Brasil, 2004, p. 16.

HINTON, D.E.; LAUREN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: Potential biomarkers of exposure. In: **Biomarkers of Environmental Contamination**, Lewis publishers, p.17-57, 1990.

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**, v. 104, p.147–152, 1982.

HOSE, J.E.; CROSS, J.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminates sites off Southern California. **Mar. Environ. Res**, v. 22, p. 167-176, 1987.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

HUGGETT, R.J.; KIMERIE, R.A.; MEHRIE JR., P.M.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

JIN, H.H.; LEE, J.H.; HYUN, C.K. Detection of DNA damage in carp using single-cell gel electrophoresis assay for genotoxicity monitoring. **Journal of Microbiology and Biotechnology** , v. 14, n. 2, p. 268-275, 2004.

KAMMANN, U.; RIGGERS, J.C.; THEOBALD, N.; STEINHART, H. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. **Mutation Research**, v. 467, p. 161-168, 2000.

KIM, I.Y.; HYUN, C.K. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 288-297, 2006.

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.

KLOBUCAR, G.I.V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquat. Toxicol**, v. 64, p. 15-23, 2003.

KURELEC, B. The genotoxic disease syndrome. **Mar. Environ. Res.**, v. 35, p. 341-348, 1993.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43-64, 2003.

LEITÃO, M.A.S.; AFFONSO, E.G.; da SILVA, M.F.E.; MEIRELLES, N.C.; RANTIN, F.T.; VERGESI, A.E.; JUNQUEIRA, V.B.C.; DEGTEREV, I.A. The liver monooxygenase system of brazilian freshwater fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 126, p. 29-38, 2000.

LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197-201, 2005.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

LINDER, M. C. Changes in the distribution and metabolism of copper in cancer: a review. **J. Nutr. Growth Cancer**, v. 1, p. 27-38, 1983.

LINDER, M. C. Copper and genomic stability in mammals. **Mutation Research**, v. 475, p. 141-152, 2001.

LIU, W.; YANG, Y.S.; LI, P.; ZHOU, Q.; SUN, T. Root growth inhibition and induction of DNA damage in soybean (*Glycine max*) by chlorobenzenes in contaminated soil. **Chemosphere**, v. 57, p. 101-106, 2004.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v. 57, p. 195-211, 1993.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physio.**, v. 120A, p. 43-49, 1998.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research**, v. 399, p. 3-15, 1998.

LOWE-McCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999.

LUCARELLI, A.C.T. **Biomarcadores de estresse oxidativo em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Teleostei; Cichlidae) expostas ao sulfato de cobre aquático**. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

LUCENA, C.A.S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 125p, 1993.

MA, X.L.; COWLES, D.L. ; CARTER, R.L. Effect of pollution on genetic diversity in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* and the acorn barnacle *Balanus glandula*. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 559-563, 2000.

MALINS, D.C.; KRAHN, M.M.; MYERS, M.S.; RHODES, L.D.; BROWN, D.W.; KRONE, C.A.; McCAIN, B.B.; CHAN, S.L. Toxic chemicals in sediments and biota from a creosote polluted harbor: Relationship with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (*Paraphrys vetulus*). **Carcinogenesis**, v. 6, p. 1463-1469, 1985.

MANNA, G.K.; SADHUKHAN, A. Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT). **Curr. Sci**, v. 55, p. 498-501, 1986.

MATER NATURA. Programa de Educação Ambiental para a Bacia do Iraí – ProLago do Iraí. Disponível em: <http://www.maternatura.org.br>. Acesso em: 14 jul. 2006.

MATSUI, S. Evaluation of a *Bacillus subtilis* rec. assay for the detection of mutagens which may occur in aquatic environment. **Water Research**, v. 14, p. 613-619, 1980.

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

McGLASHAN, D.J.; HUGHIES, J.M. Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range. **Journal of Fish Biology**, vol. 59, p. 55-67, 2001.

MELO, F.A.G. **Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei, Characiformes, Characidae) da região da Serra dos Órgãos**. Arq. Nac. Rio de Janeiro, v. 59, p. 1-46, 2001.

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**, v. 399, p. 135-147, 1998.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y.F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation Research**, v. 418, p. 131-140, 1998.

MONSERRAT, J.M., YUNES, J.S.; BIANCHINI, A. Effects of *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1228-1235, 2001.

MOREIRA-FILHO, O. **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1989.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L.A.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO FILHO, S.A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235-244, 1983.

MOTTA, S. **Introdução à Engenharia Ambiental**. 1ª edição, ed: ABES, Rio de Janeiro, 280p, 1997.

NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v. 35, p. 197-210, 1996.

NACCI, D.; NELSON, S.; NELSON, W.; JACKIM, E.; Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves, **Marine. Environmental Research**, v. 33, p. 83-100, 1992.

NAKAGAWA, L.E. **Alteração de características do solo para remoção de hexaclorobenzeno de área contaminada**. São Paulo (SP), Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2003.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce**: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá, EDUEM, 2001.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley, 1984.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3rd edition: John Wiley e Sons, New York, USA, 600p., 1994.

NEPOMUCENO, J.C.; FERRARI, I.; SPANO, M.A.; CENTENO, A.J.; Detection of the micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 30, p. 293-297, 1997.

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

NRIAGU, J.O. Geochim. Cosmochim. **Acta**, v. 37, p. 367-377, 1973.

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**, v. 198, p. 259-267, 1992.

OLIVER, Ph., MARZIN, D. Study of genotoxicity potential of 48 inorganic derivatives with the SOS-chromotest. **Mutation Research**, v. 189, p. 263-269, 1987.

ORSI, M.L.; SHIBATTA, O.A.; SILVA-SOUZA, A.T. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis. In: MEDRI, M. E., BIANCHINI, E., SHIBATTA, O. A., PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

PANDEY, S. ; NAGPURE, N.S. ; KUMAR, R. ; SHARMA, S. ; SRIVASTAVA, S.K. VERMA, M.S. Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 65, v. 1, p. 56-61, 2006.

PANDRANGI, 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.

PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287-292, 2005.

QUENTAL, N.; MORAIS, M.J.M. Grupo de Estudos Ambientais - Universidade Católica Portuguesa. Disponível em: <http://www.esb.ucp.pt/gea/myfiles/pops/POPs/hexaclorobenzeno.htm>. Acesso em 18 out. 2006.

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.

RAJAGURU, P.; VIDYA, L.; BASKARASETHUPATHI, B.; KUMAR, P.A.; PALANIVEL, M.; KALAISELVI, K. Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. **Mutation Research**, v. 517, p. 29-37, 2002.

RAMSDORF, W. A. **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 – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, 2005.

RANK, J.; JENSEN, K.; JESPERSEN, P. H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled in costal sites from Denmark. **Mutation Research**, v. 585, p. 33-42, 2005.

REBOUÇAS, A. C. Disponibilidade de água: cenários e perspectivas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 12, n. 1, 1999.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

RELATÓRIO FINAL DO ZONEAMENTO ECOLÓGICO ECONÔMICO (ZEE) DA APA DO IRAÍ E PROGRAMA DE AÇÃO EMERGENCIAL, 2000.

RODRIGUEZ-CEA, A. AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 442-448, 2003.

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.

ROSEN, G. Mutations induced by the action of metal ions in *Pisum* II. **Hereditas**, v. 51, p. 90-94, 1964.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M.A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 168-174, 2004.

SAMPAIO, F.A.A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysi) da Bacia do Rio Iguazu, com comentários sobre o endemismo desta fauna.** São Carlos (SP). Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 1988.

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. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p. 301-304, 1999.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 139-143, 2001.

SANTOS, L. S.; MEIRE, R. O.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Avaliação de micropoluentes orgânicos em material particulado e solo ao longo do Rio Madeira. In: Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, VIII, 2004, Florianópolis – SC. **Resumos...** Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, SETAC Brasil, 2004, p. 16.

SANTOS, E. **Peixes de água doce.** Ed. Itatiaia. Belo Horizonte, 1981.

SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, F.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, v. 393, p. 133-139, 1997a.

SASAKI, Y.F.; TSUDA, S.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, 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, 1997b.

SAVAGE, J.R.K. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. **Enviro. Mol. Mutagen**, v. 22, p. 198-207, 1993.

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

SETTI, A.A. Diagnóstico sobre a situação dos mananciais dos 20 municípios selecionados dos Estados do Acre, Pará, Ceará, Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás e Proposta de Estruturação do Programa de Preservação e Conservação de Mananciais. **Relatório Técnico: PNMA, Contrato nº96/9596**, 383p., 1998.

SEVERI, W.; CORDEIRO, A. A. M. **Catálogo de peixes da bacia do rio Iguaçu**. Curitiba: IAP/GTZ. 128p, 1994.

SHIBATTA, O. A.; ORSI, M. L.; BENNEMANN, S. T; SILVA-SOUZA, A. T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E., BIANCHINI, E., SHIBATTA, O. A., PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

SINA , F.F.; BEAN, C.L.; DYSART, G.R.; TAYLOR, V.I.; BRADLEY, M.O. Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential. **Mutation Research**, v. 113, p. 357-391, 1983.

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.

SIU, W.H.L. ; CAO, J. ; JACK, R.W. ; WU, R.S.S. ; RICHARDSON, B.J. ; XU, L. ; LAM, P.K.S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B(A) P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 381-392, 2004.

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

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S. (Ed.), **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols – Eukaryotic Systems**, vol. 113, Human Press, Totowa, p. 203-211, 1999.

TARIFENO-SILVA, E.; KAWASAKI, L.; YN, D.P.; GORDON, M.S.; CHAPMAN, D.J. Aquacultural approaches to recycling dissolved nutrients in secondarily treated domestic waste waters: uptake of dissolved heavy metals by artificial food chains. **Water Research**, v. 16, p. 59-65, 1982.

THEODORAKIS, C.W.; BICKHAM, J.W.; LAMB, T. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada test site, USA, **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 20, p. 317-326, 2001.

THOMPSON, H.M.; LANGTON, S.D.; HART, A.D.M. Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife – a biochemical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111C, p. 1-12, 1995.

TINWELL, H.; ASHBY, J. Inactivity of copper sulphate in a mouse bone-marrow micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 245, p. 223-226, 1990.

UFPR – Site da Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <http://www.ufpr.br>. Acesso em: 26 jul. 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VARANASI, U.; REICHERT, W.L.; LE EBERHART, B.T.; STEIN, J.E. Formation and persistence of benzo(a)pyrene-diolepoxide DNA adducts in liver of English sole (*Paraphrys vetulus*). **Chem. Biol. Interact.**, v. 69, p. 203-216, 1989.

VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

VON SPERLING, E. **Morfologia de lagos e represas**. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1999.

VRZOC, M.; PETRAS, M.L. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting. **Mutation Research**, v. 381, p. 31-40, 1997.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, Bristol, PA 1996.

WEITZMAN, S.H.; FINK, W.L. Relationship of the neon tetras, a group of South American freshwater fish (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of New World Characiforms. **Bull Mus. Comp. Zool.**, v. 150, p. 339-395, 1983.

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

WINTER, M.; DAY, N.; HAYES, R.; TAYLOR, E.; BUTLER, P.; CHIPMAN, J. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. **Mutation Research**, v. 552, p. 163-175, 2004.

XAVIER, C.F. **Avaliação da influência do uso e ocupação do solo e de características geomorfológicas sobre a qualidade das águas de dois reservatórios da Região Metropolitana de Curitiba** – Paraná. Dissertação de Mestrado em Ciências do Solo, UFPR, Curitiba, 2005.

XIMENES, J. F. **Enciclopédia Ambiental – Poluição Industrial**. Disponível em: <http://www.encyclopediambiental.hpg.ig.com.br>. Acesso em 10 de outubro de 2006.

YANG, X.; TAKAHASHI, M. Disturbance of the determination of germinal and somatic nuclei by *Paramecium caudatum*, **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 46, p. 49-55, 1999.

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.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 143, p.187-195, 2006.

ZENG, D.; LI, Y.; LIN, Q. Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People's Republic of China, **Mutation Research**, v. 426, p. 19-161, 1999.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 01 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E ESCORES DO ENSAIO COMETA EM SANGUE, CÉLULAS DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL REFERENTES À COLETA 1 REALIZADA NO PARQUE ECOLÓGICO COSTA (FEV/05)

<i>Astyanax sp B</i>

Animal	Sexo	Micronúcleo	Escore Sangue	Escore Fígado	Escore Rim
		+ Alterações			
1	m	3	61	67	30
2	m	2	44	52	96
3	m	1	44	17	82
4	f	2	50	73	49
5	f	2	43	32	21
6	f	1	120	80	31
7	m	0	71	29	42
8	f	3	70	89	24
9	f	2	54	43	68
10	f	5	44	35	28
11	m	1	36	28	58
12	m	0	18	20	75

- Observação: Nenhum exemplar da espécie *A. altiparanae* foi coletado.

APÊNDICE 02 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E ESCORES DO ENSAIO COMETA EM SANGUE, CÉLULAS DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL REFERENTES À COLETA 2 REALIZADA NO PARQUE ECOLÓGICO COSTA (OUT/05)

Astyanax sp B

Animal	Sexo	Micronúcleo + Alterações	Escore Sangue	Escore Fígado	Escore Rim
1	m	0	85	95	58
2	m	1	192	98	68
3	m	5	38	69	51
4	f	2	73	157	64
5	f	2	48	71	46
6	f	1	77	93	71
7	f	0	187	84	53
8	f	1	177	82	62
9	m	0	76	91	46

Astyanax altiparanae

10	f	1	58	130	81
11	f	5	157	65	86
12	f	4	156	69	68
13	f	3	78	42	83
14	m	3	112	92	64
15	f	6	223	41	89
16	f	3	26	105	44
17	m	6	206	53	89

APÊNDICE 03 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E ESCORES DO ENSAIO COMETA EM SANGUE, CÉLULAS DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL REFERENTES À COLETA 3 REALIZADA NO PARQUE ECOLÓGICO COSTA (FEV/06)

<i>Astyanax sp B</i>						
Animal	Sexo	Micronúcleo + Alterações	Escore Sangue	Escore Fígado	Escore Rim	
1	f	3	105	86	96	
2	m	0	104	171	97	
3	f	4	103	137	164	
4	m	8	103	126	53	
5	m	6	114	157	61	
6	f	2	88	84	128	
7	f	6	110	175	136	
8	f	0	72	78	80	
9	f	4	70	57	166	
10	m	2	44	109	62	
11	m	1	122	102	33	
12	m	2	96	102	54	
13	m	0	51	54	59	
<i>Astyanax altiparanae</i>						
14	f	1	94	196	98	
15	m	2	133	90	76	
16	f	4	121	176	129	
17	m	4	161	69	174	
18	m	2	173	99	151	
19	m	0	130	147	113	
20	m	6	115	164	99	
21	f	1	108	160	162	
22	m	5	72	71	123	
23	m	0	60	101	65	

APÊNDICE 04 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E ESCORES DO ENSAIO COMETA EM SANGUE, CÉLULAS DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL REFERENTES À COLETA 1 REALIZADA NA FAZENDA EXPERIMENTAL DO CANGUIRI (ABR/05)

<i>Astyanax sp B</i>						
Animal	Sexo	Micronúcleo + Alterações	Escore Sangue	Escore Fígado	Escore Rim	
1	m	7	349	262	169	
2	f	3	241	111	170	
3	?	8	350	94	195	
4	m	1	348	146	106	
5	?	6	372	101	147	
6	f	4	224	141	100	
7	f	4	330	53	193	
8	?	4	326	115	148	
9	f	6	270	115	123	
10	f	5	362	209	85	
11	m	4	373	149	191	
12	f	2	239	190	241	
13	f	3	181	121	106	
14	?	4	333	72	229	
15	f	6	373	137	177	
16	f	5	287	180	195	
<i>Astyanax altiparanae</i>						
17	f	7	389	112	84	
18	m	4	311	105	217	
19	m	3	376	214	133	
20	m	2	298		167	
21	m	9	295	90	88	

APÊNDICE 05 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E ESCORES DO ENSAIO COMETA EM SANGUE, CÉLULAS DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL REFERENTES À COLETA 2 REALIZADA NA FAZENDA EXPERIMENTAL DO CANGÜIRI (NOV/05)

Astyanax sp B

Animal	Sexo	Micronúcleo	Escore Sangue	Escore Fígado	Escore Rim
		+ Alterações			
1	m	1	170	233	145
2	m	1	180	161	158

Astyanax altiparanae

3	f	1	158	235	248
4	m	3	273	225	174
5	f	7	284	244	187
6	f	3	228	201	149
7	m	4	212	158	78
8	m	4	242	203	124
9	m	15	311	144	109
10	m	2	308	239	182
11	f	1	181	209	274
12	m	1	246	176	142
13	m	1	326	193	115
14	f	4	314	207	291
15	f	9	286	156	90
16	m	3	239	233	119
17	m	2	184	229	68
18	m	1	253	185	159
19	m	6	215	189	122
20	m	3	215	247	118
21	m	2	221	221	176
22	f	5	247	141	72
23	m	5	256	212	169

APÊNDICE 06 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E ESCORES DO ENSAIO COMETA EM SANGUE, CÉLULAS DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL REFERENTES À COLETA 3 REALIZADA NA FAZENDA EXPERIMENTAL DO CANGÜIRI (ABR/06)

Astyanax sp B

Animal	Sexo	Micronúcleo + Alterações	Escore Sangue	Escore Fígado	Escore Rim
1	f	8	155	61	144
2	f	5	112	116	113
3	f	5	88	113	111
4	f	18	172	89	75
5	f	7	109	117	95
6	m	7	139	92	56
7	m	5	127	97	155
8	m	6	101	116	113
9	f	7	95	128	128
10	m	4	118	68	109

Astyanax altiparanae

11	f	1	146	126	78
12	f	6	136	95	150
13	m	2	176	142	98
14	f	4	128	130	109
15	f	4	155	127	126
16	m	5	141	156	116
17	m	5	110	162	105
18	m	6	125	117	120

APÊNDICE 07 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E ESCORES DO ENSAIO COMETA EM SANGUE, CÉLULAS DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL REFERENTES AO BIOENSAIO REALIZADO COM SULFATO DE COBRE (0,25 mg/L) POR 72 HORAS, UTILIZANDO A ESPÉCIE *Astyanax sp B*

Animal	sexo	Micronúcleo + Alterações	Cometa sangue	Cometa fígado	Cometa rim	Situação
1	f	5	223	118	220	contaminado
2	f	8	300	123	134	contaminado
3	f	12	217	125	109	contaminado
4	f	12	337	102	117	contaminado
5	f	3	300	180	141	contaminado
6	f	11	259	23	151	contaminado
7	f	20	244	129	137	contaminado
8	f	3	272	124	203	contaminado
9	f	2	274	135	212	contaminado
10	m	13	301	135	43	contaminado
11	f	18	258	146	185	contaminado
12	f	15	276	139	165	contaminado
13	f	42	239	133	117	contaminado
14	f	21	299	157	210	contaminado
15	f	17	242	112	150	contaminado
16	f	8	272	165	230	contaminado
17	f	7	262	127	122	contaminado
18	f	28	97	222	204	contaminado
19	m	2	53	125	53	controle
20	f	5	168	113	148	controle
21	f	3	164	131	174	controle
22	f	14	169	124	215	controle
23	f	7	187	140	77	controle
24	f	3	137	171	121	controle
25	f	5	120	153	131	controle
26	f	7	270	127	270	controle
27	f	9	73	186	151	controle
28	f	4	188	147	93	controle
29	m	0	226	198	169	controle
30	m	3	168	195	163	controle
31	f	1	71	131	68	controle
32	f	13	181	134	128	controle
33	m	4	226	154	145	controle
34	f	13	200	118	121	controle
35	f	4	121	127	144	controle
36	f	2	127	159	132	controle

APÊNDICE 08 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE ALTERAÇÕES NUCLEARES, E ESCORES DO ENSAIO COMETA EM SANGUE, CÉLULAS DE TECIDOS HEPÁTICO E RENAL REFERENTES ÀO BIOENSAIO REALIZADO COM SULFATO DE COBRE (0,25 mg/L) POR 72 HORAS, UTILIZANDO *A. altiparanae*

Animal	sexo	Micronúcleo + Alterações	Cometa sangue	Cometa fígado	Cometa rim	situação
40	f	9	205	139	119	contaminado
41	f	15	161	155	92	contaminado
42	f	5	176	166	112	contaminado
43	f	6	147	130	60	contaminado
44	f	27	161	132	178	contaminado
45	f	3	181	142	103	contaminado
46	f	12	77	166	111	contaminado
47	f	4	167	121	122	contaminado
48	f	13	157	107	134	contaminado
49	f	11	159	146	128	contaminado
50	f	9	119	80	97	contaminado
53	f	5	107	124	71	contaminado
54	f	2	115	163	69	contaminado
55	m	4	131	180	101	contaminado
56	f	7	58	135	84	contaminado
57	f	17	165	107	110	contaminado
58	f	1	124	148	131	contaminado
59	m	3	164	149	138	contaminado
60		1	171	118	180	contaminado
61		11	169	143	147	contaminado
51	f	6	130	130	115	controle
52	m	2	109	134	115	controle
62	f	10	132	83	88	controle
63	f	12	73	137	102	controle
64	f	4	210	143	106	controle
65	f	4	108	119	92	controle
66	f	5	158	134	174	controle
68	f	3	168	186	136	controle
69	f	3	155	157	55	controle
70	m	8	95	164	185	controle
71	f	1	74	182	74	controle
72	f	11	195	141	121	controle
73	m	3	159	154	72	controle
74	m	2	136	142	127	controle
75	m	9	116	64	134	controle
76	m	3	162	165	167	controle
77	f	2	68	132	50	controle
78	m	6	98	111	117	controle
79	f	1	121	125	107	controle

