
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS CITOTÓXICO,
GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DAS ÁGUAS DE UM
AMBIENTE LÊNTICO, POR MEIO DOS SISTEMAS-TESTE
DE *Allium cepa* E *Oreochromis niloticus***

CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).

Agosto - 2008

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS CITOTÓXICO,
GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DAS ÁGUAS DE UM
AMBIENTE LÊNTICO, POR MEIO DOS SISTEMAS-TESTE
DE *Allium cepa* E *Oreochromis niloticus***

CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 2008

574.5263 Christofolletti, Cintya Aparecida

C556a Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e
mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio
dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* /
Cintya Aparecida Christofolletti. – Rio Claro : [s.n.], 2008
118 f. : il., tabs, gráfs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Ecologia aquática. 2. Monitoramento ambiental. 3.
Aberrações cromossômicas. 4. Anormalidades nucleares. 5.
Ensaio do cometa. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

**Dedico este trabalho aos
meus pais, Almir e Analice,
aos meus irmãos, Diego e
Eduardo e ao meu noivo,
Juliano, pessoas que me
apoiam e estiveram
comigo nos momentos de
dificuldades e alegrias.**

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos às instituições:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida (processo: 132741/2007-5).

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro. Ao Instituto de Biociências e Laboratório de Mutagênese por me acolher e fornecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho e aprimoramento de meus conhecimentos.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UNESP pela concessão de auxílio financeiro para participação em congressos.

Meus agradecimentos à Prefeitura Municipal de Rio Claro/SP, na pessoa do Sr. Antonio Fernando David Reginato, secretário de Agricultura, Abastecimento e Silvicultura, pela autorização das coletas de águas, ao administrador do Lago Azul, Sr. Marcuci e ao Sr. Brás, pelo suporte técnico.

Agradeço também minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Carmem S. Fontanetti Christofolletti – sem parentesco (risos), exemplo de pessoa e profissional. Sou extremamente grata pela orientação, paciência, convívio, conversas e risadas. Agradeço também a amizade e o carinho.

Aos meus pais, Almir e Analice, por abdicar de seus sonhos, para que os meus se tornassem realidade. Meus irmãos, Diego e Eduardo, pelo apoio e incentivo. Ao Edu, por me auxiliar com as pranchas de fotos.

Ao meu noivo Juliano, por compartilhar e participar da realização deste trabalho. Obrigada por sempre me escutar, apoiar, incentivar e acreditar que eu era capaz. Aos meus sogros (Itamar e José) e minha cunhada Daniela, pelo carinho.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales por me ter por sua “agregada”. Agradeço pelo carinho, pelas sugestões durante a realização deste trabalho e pelo constante incentivo.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, por disponibilizar o Departamento de Bioquímica da UNESP de Rio Claro para a realização dos bioensaios. Ao Zito, por todo o cuidado e suporte com meus peixes.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, área de Biologia Celular e Molecular, por terem contribuído para minha formação. Em especial à Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi, Profa. Dra. Sanae Kasahara, Profa. Dra. Doralice Maria Cella, Profa. Dra. Ana Maria Costa Leonardo, Profa. Dra. Maria Izabel Camargo e Profa Dra. Lúcia Regina Ribeiro.

Aos funcionários da UNESP: Serginho e do Departamento de Biologia, Neuza Ap. Perinotto, Lucila Segala Franco e Maria da Graça Reis.

À Cristiane M. Mileo, pela amizade e por me ajudar com a montagem das pranchas.

Aos técnicos de laboratório Sandra Veloso, Rogilene Aparecida Prado, Gerson Mello Souza e Anderson, pelo auxílio indispensável.

Ao Zé Augusto e Márcia, pela ajuda e sugestões, principalmente no ensaio do cometa. Agradeço também o carinho e a amizade.

Ao Frederico Biagini, por me ajudar com as coletas de águas e peixes e, mesmo distante, por toda a torcida.

Ao grupo de Estudos de Toxicologia e Mutagênese Ambiental (GETMA), do Laboratório de Mutagênese, da UNESP de Rio Claro. Grupo formado por pessoas incríveis: Bárbara, Bruna, Cristiane, Dânia, Daniela, Davi, Izabela, Janaína, Jaqueline, Livia, Márcia, Matheus, Nádia, Renata, Tatiana e Thaís, sempre dispostas a ajudar e colaborar; que fazem do convívio do laboratório uma diversão. Agradeço o auxílio com o presente trabalho e por todos os momentos descontraídos. Vocês não sabem o quanto me orgulho de fazer parte deste grupo.

Meu obrigado especial à minha amiga Bruna, pelas conversas, dicas e por toda a ajuda, principalmente nos finais de semana. À Dânia, quem me ensinou a montar a minha primeira lâmina de cebola; pela coleta de águas no lago e por sempre estar disposta a me ajudar. À Janaína, por se mostrar uma grande amiga. Ao Matheus e a

Rê, por sempre estarem de bom humor, pela ajuda com os peixes e por me tratarem sempre com muito carinho. À Tati, pelas discussões de artigos, pela companhia nos congressos e pela amizade. À Thaís, por ser tão prestativa e estar sempre disposta a me ajudar; obrigada pelas coletas e por todo o auxílio com os peixes. Agradeço também a amizade e o carinho. Sem a sua ajuda, parte deste trabalho não seria realizado!

Ao Eduardo Murakami pelo carinho.

Às alunas da graduação Danila Torres e Luciana Tendolini Brito, pelo auxílio com as coletas de águas. À Débora (monitora) pelo carinho e amizade.

Aos amigos do laboratório de Citogenética e do Departamento de Biologia: Ana Cláudia, Ariane, Cris, Danielle, Débora, Duda, Flávia, Fred, Gal, Giovana, Jaque de Bem, Karin, Larissa, Marielle, Milena, Reinaldo, Sandra, Thiago e Vlamir.

Aos meus amigos, que muito me escutaram e suportaram toda a minha preocupação com o desenvolvimento deste trabalho: Karina e Jean, Cristiane e Rael, Marina e Daniel, Danielle e Luiz, Sandra, Celina, Thays Abreu e Márcia Bortolin.

RESUMO

A degradação dos recursos hídricos, como os ambientes lênticos, dentre eles, os lagos, é uma das maiores preocupações atualmente, visto que esta pode causar danos diretos ou indiretos à saúde e à sobrevivência dos organismos expostos. Um dos fatores que contribui para a alteração da qualidade das águas de ambientes lênticos é o despejo de efluentes, principalmente àqueles de origem doméstica, portadores de substâncias que chegam a ser tóxicas para o meio aquático. Por meio dos testes citogenéticos, utilizando os mais diversificados organismos-teste, é possível biomonitorar a extensão da poluição e avaliar os efeitos dessas substâncias presentes no ambiente natural. Com esse intuito, o presente trabalho tomou por modelo de estudo, um lago urbano artificial (Lago Azul, Rio Claro-SP) e objetivou avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas desse ambiente, por meio dos testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos, em células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola), em dois tratamentos: o contínuo e o período de recuperação, em água ultra pura; e, pelo teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares e do ensaio do cometa, aplicados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (tilápia). Coletas de águas sazonais foram realizadas na estação seca (agosto/2006 e agosto/2007) e na estação chuvosa (março/2007 e fevereiro/2008). Análises físico-químicas foram feitas para uma coleta de cada estação. A partir dos dados obtidos, pode-se inferir que as águas desse ambiente lêntico apresentam potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, nas duas estações de coletas, para os dois organismos-teste empregados. As análises de metais revelaram concentrações acima do permitido pela legislação de Ag, Cd²⁺, Cu e Fe³⁺, em ambas as estações. Embora os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico tenham sido detectados nas duas estações, a estação seca é a que apresentou maior risco, pois neste período, as análises de metais evidenciaram elevadas concentrações de Al³⁺ e Hg. Concluiu-se que os resultados obtidos são decorrentes da influência da sazonalidade, uma vez que na estação chuvosa há um maior carreamento de substâncias citotóxicas pelas águas das chuvas e, na estação seca, uma maior concentração dos poluentes devido à diminuição do volume de água, acarretando em uma maior interação dos elementos presentes no sedimento com a coluna d'água.

Palavras-chave: micronúcleos, aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares, ambiente lêntico.

ABSTRACT

The degradation of water resources, as the lentic environments, among them, the lakes, is a major concern now, because it can cause direct or indirect damages to health and to the survival of the exposed organisms. One factor that can contribute to change the water quality of lentic environments is the dumping of effluents, mainly those of domestic origin, carriers of substances that come to be toxic to the aquatic environment. Through the cytogenetic tests, using the most diverse systems-test, it is possible monitoring the extent of pollution and assess the effects of substances on the natural environment. To that end, this work has taken a model of study, an urban artificial lake (Lago Azul, Rio Claro-SP) and aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials of waters that environment, through tests of chromosome aberrations and micronuclei in meristematic cells of *Allium cepa* (onion) in two treatments: the continued and the period of recovery, in ultra pure water, and by the micronucleus and nuclear abnormalities test and of the comet assay, applied in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (tilapia). Seasonal collections of waters were held in the dry season (august/2006 and august/2007) and the rainy season (march/2007 and february/2008). Physical and chemical analyses were made for a collection of each season. From the data obtained, it can be inferred that the waters of this lentic environment had cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials in two seasons of collections for the two systems-test employed. Analyses of metals detected high concentrations of Ag, Cd²⁺, Cu, Fe³⁺, whose values are higher than permitted by law, in both seasons. Although the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials have been detected in two seasons, the dry season is that presented the highest risk, because in this period, the tests showed high concentrations of metals Al³⁺ and Hg. It was concluded that the results are arising from the influence of seasonality, since the rainy season there is a greater carried of cytotoxic substances by the waters of the rain, and in the dry season, a greater concentration of pollutants due to reduced of water content, resulting in greater interaction of elements present in the sediment to the water column.

Key-words: micronuclei, chromosome aberrations, nuclear abnormalities and lentic environment.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. REVISÃO DA LITERATURA	
3.1. Genética Toxicológica.....	04
3.2. Genotoxicidade de metais pesados.....	06
3.3. O uso de <i>Allium cepa</i> como sistema-teste para o monitoramento ambiental.....	10
3.4. Teste de aberrações cromossômicas.....	11
3.5. Peixes como organismo-teste e algumas considerações sobre a espécie <i>Oreochromis niloticus</i>	12
3.6. Teste do micronúcleo.....	14
3.7. Ensaio do cometa.....	17
3.8. Ecossistemas lênticos como modelo de estudo.....	19
3.9. Caracterização da área de estudo e padrões de qualidade de água para a saúde pública – classificação das águas segundo resolução 357/2005 (CONAMA).....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5. RESULTADOS	
5.1 Dificuldades encontradas.....	31
5.2 Problemas com o sistema-teste de <i>O. niloticus</i>	31
Artigo 1. Application of the comet assay in erythrocytes of <i>Oreochromis niloticus</i> (Pisces): a methodological comparison.....	36
Artigo 2. A utilização do organismo-teste <i>Oreochromis niloticus</i> no monitoramento ambiental de um ecossistema lêntico.....	54

Artigo 3. O uso do <i>Allium test</i> para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidadede um ambiente lântico – um estudo de caso.....	78
6. DISCUSSÃO GERAL.....	102
7. CONCLUSÃO.....	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

A poluição dos recursos hídricos é um problema sério e preocupante. Atualmente, é crescente essa preocupação em diagnosticar e monitorar a poluição ambiental aquática. Segundo Odum (1988), os ecossistemas de água doce, juntamente com os estuários, fornecem os sistemas mais baratos e convenientes para descarte de efluentes. Quase sem exceção, as maiores cidades do mundo estão localizadas próximos de grandes rios, lagos e estuários que servem como “esgotos gratuitos”.

Dentre os problemas mais graves que afetam a qualidade da água de rios e lagos encontram-se: os esgotos domésticos tratados de forma inadequada; o controle inadequado de efluentes industriais, que constituem, indiscutivelmente, a maior fonte antrópica de compostos químicos lançados nos corpos d'água, além da perda e destruição das bacias de captação; a localização errônea das unidades industriais e o desmatamento (VEGA et al., 1996; MORAES e JORDÃO, 2002).

Muitos desses efluentes constituem misturas tóxicas, tais como agrotóxicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), metais pesados e uma enorme gama de substâncias que, conjuntamente, podem agravar ainda mais as condições ambientais e, conseqüentemente, todo o ecossistema (VEGA et al., 1996). Logo, é de fundamental importância, a realização de testes que avaliem a toxicidade e a genotoxicidade, para se verificar as reações dos organismos vivos à poluição, uma vez que os produtos gerados pela tecnologia atingem os mais diferentes ambientes (aquático e terrestre), causando mutações que podem afetar, muitas vezes, não só o indivíduo como também os seus descendentes (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Na detecção desses danos, vários organismos-testes mostram-se eficientes quando utilizados em avaliações de possíveis efeitos de contaminação, baseados na demonstração dos danos cromossômicos, como: alterações estruturais, formação de micronúcleos, troca de cromátides-irmãs, avaliação de genes mutantes ou de danos no DNA (PEÑA, 1996).

Testes que avaliem a toxicidade e a genotoxicidade são indispensáveis para se verificar as reações dos organismos vivos à poluição e para indicar o possível efeito sinérgico de vários poluentes, uma vez que, análises físicas e químicas da água indicam somente a presença e a concentração de diferentes poluentes (SMAKA-KINCL et al., 1996; MATSUMOTO et al., 2006).

Os lagos, considerados como ambientes lênticos, do ponto de vista científico,

possuem uma dinâmica muito particular quanto a interação do sedimento com a coluna d'água e a ação dessa água nos organismos expostos, o que os tornam interessantes objetos de estudos de biomonitoramento ambiental, além de oferecer inúmeras finalidades, como: abastecimento, irrigação, lazer e pesca. Logo, problemas derivados da redução da qualidade das águas destes ambientes têm merecido especial atenção (ESTEVES, 1998; MORAES e JORDÃO, 2002).

Neste contexto, devido à importância dos ambientes lânticos, somada à falta de informações relacionadas a eles, este estudo objetivou estudar as águas de um lago urbano que sofre influência de águas pluviais. Segundo os órgãos municipais locais, não há influência de efluentes domésticos neste lago, mas sim, de águas decorrentes da lavagem de vários postos de combustíveis localizados em seu entorno. Em contradição, a pesca foi proibida pela Prefeitura Municipal, após relato de que pessoas que consumiam os peixes do local apresentaram problemas de saúde.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar a potencialidade citotóxica, genotóxica e mutagênica das águas de uma ambiente lântico (Lago Azul), na cidade de Rio Claro-SP, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*.

Objetivos específicos:

- Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, de um ambiente lântico, por meio das análises da frequência do índice mitótico, aberrações cromossômicas e micronúcleos, em células meristemáticas de *Allium cepa*;
- Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico, das águas deste mesmo ambiente, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo e de outras anormalidades nucleares, aplicados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*;
- Avaliar a influência da sazonalidade sobre os resultados das avaliações genotóxica e mutagênica de um dos recursos hídricos da cidade de Rio Claro.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Genética Toxicológica

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA, alterando a sua estrutura ou função. Quando essas alterações se fixam e adquirem a capacidade de serem transmitidas, passam a ser denominadas de mutações (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003).

As mutações são a origem de toda a variabilidade genética, sendo fundamentais para a manutenção das espécies. Por isso, se diz que, sem a mutação, a vida seria inimaginável, apesar do potencial danoso que ela possui (ERDTMANN, 2003). Embora ocorram mutações espontâneas, a maioria das mutações é induzida pela exposição dos organismos a diversos agentes.

As mutações são convencionalmente classificadas em gênicas (ou pontuais) e cromossômicas. As mutações gênicas referem-se às mudanças de um ou poucos nucleotídeos do polímero de DNA, por deleções, duplicações e/ou alterações de pares de bases, que acabam modificando, portanto, o funcionamento de um gene. Já nas mutações cromossômicas, há uma reorganização na estrutura do DNA por translocação, inversão, deleção, duplicação, fusão e fissão dos cromossomos, alterando o complemento cromossômico em estrutura e/ou número (ERDTMANN, 2003; JUNDI; FREITAS, 2003).

De acordo com Mitchelmore e Chipman (1998), a genotoxicidade, atividade de um agente tóxico capaz de danificar a molécula de DNA, é sem dúvida, uma consequência da poluição ambiental. Os compostos genotóxicos e mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas aquáticos e terrestres (solo e ar), sendo transferidos e acumulados, podendo causar efeitos deletérios aos organismos expostos (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003).

A preocupação em detectar os problemas causados por agentes genotóxicos inseridos no meio ambiente alcançou atenção mundial, após as bombas de Hiroshima e Nagasaki (HENRIQUES; LEITÃO, 2008).

Este tema tornou-se um assunto altamente relevante com as publicações da revista *Mutation Research*, em 1964, quando os geneticistas que trabalhavam com os efeitos da radiação ionizante e de agentes químicos, fundaram a Sociedade Americana de Mutagênese (*Environmental Mutagen Society*), em 1969, seguida pela criação de inúmeras outras sociedades, preocupadas com o mesmo propósito (RIBEIRO et al., 2003).

Logo após, novas ciências como a Genética Toxicológica e a Ecotoxicologia foram

surgindo, com o intuito de avaliar as interações entre os químicos ambientais e a biota, evidenciando os efeitos adversos destes químicos aos diferentes níveis de organização biológica (FENT, 2004). O crescente interesse em estudos nesta área permitiu o desenvolvimento de inúmeras técnicas de observação dos efeitos dos poluentes em variados organismos-teste. Ferramentas genéticas estão disponíveis para o estudo da genotoxicidade e da mutagenicidade ambiental: testes citogenéticos *in vitro*; testes de mutação gênica em bactérias (teste de Ames), testes em células de mamíferos, entre outros, no sentido de avaliar, detectar e caracterizar os eventos genéticos, a fim de melhor entender como esses eventos ocorrem na complexidade dos organismos.

De acordo com Ribeiro et al. (2003) com o rápido crescimento da literatura científica relacionada a estes temas, houve um despertar dos governos mundiais, para o risco em potencial dos agentes mutagênicos para a população e para a biosfera, uma vez que houve um acúmulo de dados que sugerem que a mutagenicidade é um parecer razoável para a carcinogenicidade. Desde então, os órgãos de saúde pública e agências ambientais acrescentaram a mutagenicidade, um item a mais a ser avaliado em sua bateria de testes, antes que agentes químicos, aditivos alimentares e medicamentos fossem introduzidos no mercado.

Com o crescimento da população humana e da produção industrial houve um aumento das descargas poluidoras, que provocaram a deterioração do meio ambiente. Os ecossistemas aquáticos são os mais afetados, pois acabam de uma forma ou outra, servindo como receptores temporários ou definitivos, de uma enorme gama de substâncias, capazes de induzir danos no material genético dos organismos expostos e à população humana que interage com este ecossistema aquático (CLAXTON et al., 1998; ANDRADE et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006; EGITO et al., 2007). A poluição aquática é uma das mais preocupantes em países em desenvolvimento, visto que, em virtude das precárias condições de saneamento, tratamento de esgotos e de efluentes e a má qualidade das águas, podem provocar danos ao material genético (MATSUMOTO et al., 2006; EGITO et al., 2007).

Visto que a poluição aquática é uma das mais alarmantes, muitos estudos de biomonitoramento de águas de rios vêm sendo desenvolvidos, não só aqui no Brasil como em muitos lugares do mundo (MATSUMOTO et al., 2006; PANTALEÃO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006; EGITO et al., 2007). Porém, poucos são os estudos que relacionam a genotoxicologia com a presença de poluentes em ambientes lânticos.

3.2 Genotoxicidade de metais pesados

Nas últimas décadas, a contaminação ambiental por metais pesados tem aumentado muito, principalmente com o desenvolvimento da indústria moderna (STEINKELLNER et al., 1998; MARCANO et al., 2002).

O problema da genotoxicidade causada por tais metais tem adquirido novas dimensões com o advento da era industrial. Estes metais chegam à biosfera pelo ar, água e pelo solo. São capazes de causar grandes impactos na estabilidade dos ecossistemas, podendo até causar efeitos adversos aos seres humanos, uma vez que podem provocar efeitos tóxicos agudos e câncer em mamíferos, devido aos danos causados ao DNA (MINISSI; LOMBI, 1997; STEINKELLNER et al., 1998; PATRA et al., 2004).

Os metais são essenciais para a manutenção e evolução de todas as formas de vida, pois medeiam os estágios de disseminação da informação genética por meio do código genético. Ao mesmo tempo, os mesmos metais podem, quando presentes em excesso, ou em condições e lugares equivocados, produzirem erros no sistema de informação genética (PATRA et al., 2004).

Os metais pesados são potencialmente mutagênicos e estão seriamente relacionados com a poluição ambiental. Diversos estudos realizados com plantas têm mostrado que os efeitos genotóxicos dos metais podem ser manifestados como alterações na estrutura cromossômica, no número cromossômico e também por distúrbios no aparato mitótico (FISKEJÖ, 1983; MINISSI; LOMBI, 1997).

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum da crosta da terra. Este metal possui ação neurotóxica em humanos. Sua contaminação ocorre por via alimentar ou pela água (PATRA et al., 2000). É também um metal altamente citotóxico para as plantas (PEJCHAR et al., 2002). Acredita-se que a mais importante consequência fisiológica da toxicidade do Al seja a interrupção do crescimento da raiz das plantas e a mudança na morfologia radicular, sugerindo que o citoesqueleto seja a estrutura alvo, uma vez que causam o rompimento do aparato mitótico, por meio da inibição da polimerização dos microtúbulos (VOUTSINAS et al., 1997).

Investigações realizadas por Fiskejö (1983; 1988) com bulbos de *Allium cepa*, tratados com sais de Al, demonstraram que este tratamento levou ao desenvolvimento de duas estruturas oblongas hialinas, formadas por material extravasado do núcleo, no citoplasma de algumas células das raízes de cebola. O autor sugere ainda que a genotoxicidade do Al se deve à dissolução nuclear e aderência cromossômica.

Estudos realizados por Dovgaluyk et al. (2003), com nitrato de alumínio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$), em células meristemáticas de *A. cepa*, demonstraram que este composto resulta em um denso empacotamento dos microtúbulos nas células.

Diversos estudos têm avaliado o importante papel do alumínio como um fator de risco para a doença de Alzheimer e de outras patologias neurológicas, incluindo a doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica, bem como doenças sistêmicas, como diabetes e câncer (PROLO et al., 2007).

A prata (Ag) é um metal que ocorre naturalmente na natureza, graças aos processos naturais de erosão. Sua descarga no ambiente se dá pelo seu uso industrial (indústrias fotográficas e de eletrônicos) e pelo despejo de efluentes das estações de tratamento. É ainda um metal não essencial que, quando está presente em elevadas concentrações no ambiente aquático, intoxica os organismos, sendo que a forma iônica deste metal é, geralmente, a mais tóxica (PURCELL; PETERS, 1998; GROSSEL et al., 1999). Na literatura, a prata está relacionada a estudos com organismos aquáticos (peixes e crustáceos). Logo, nestes organismos a prata está relacionado a um desequilíbrio iônico e osmorregulatório, associado às inibições da atividade da Na^+/K^+ -ATPase e da captação de Na^+ em nível branquial (GROSSEL et al., 2002).

O cádmio (Cd) é um metal pesado comumente utilizado em estudos ambientais devido à sua alta toxicidade, larga distribuição no ambiente e longo período de meia-vida (ALMEIDA et al., 2001; MARCANO et al., 2002).

Indústrias químicas, de tintas, de impressão e têxteis são as principais fontes de contaminação por cádmio no ambiente (MARCANO et al., 2002). Em vegetais superiores, a primeira ação do Cd é interferir no fuso mitótico, induzindo alterações como: anáfases multipolares, pontes e perda cromossômica e uma distribuição desigual dos cromossomos nas células-filhas. Por atuar no aparato mitótico, o Cd também contribui para a formação de micronúcleos e inibição do índice mitótico, o que indica uma evidência indireta da genotoxicidade do Cd (MARCANO et al., 2006; SETH et al., 2008).

Em estudos realizados por Fiskejö (1988), bulbos de *A. cepa* tratados com cloreto de cádmio (CdCl_2), em diferentes concentrações, apresentaram elevadas frequências de aderência cromossômica e C-metáfases.

Voutsinas et al. (1997) utilizaram sementes de *Hordeum vulgare* para avaliar a habilidade de sete químicos ambientais, dentre eles o CdCl_2 , em provocar o rompimento dos microtúbulos das células meristemáticas das raízes desta planta, uma vez que o rompimento dos microtúbulos, induzido quimicamente, pode, durante a mitose, levar à aneuploidia. Os

autores observaram que este químico é capaz de produzir modificações na organização microtubular e reduzir a afinidade do aparato do fuso em *H. vulgare*.

Dovgalyuk et al. (2003) investigaram a ação fitotóxica do CdCl_2 em células meristemáticas de *A. cepa*. Os resultados obtidos revelaram que a exposição das raízes de cebola, a 50 μM de CdCl_2 , resultaram em um profundo distúrbio da organização microtubular e, conseqüentemente, a um severo desarranjo dos microtúbulos, evidenciados por numerosos fragmentos curtos de microtúbulos na periferia celular.

Seth et al. (2008) avaliou os efeitos citogenéticos e os danos causados ao DNA, pelo Cd, em três concentrações diferentes, por meio de aberrações cromossômicas e do ensaio do cometa, em células meristemáticas de *A. cepa*. Os autores relatam que as três concentrações de Cd foram capazes de inibir o índice mitótico, induzir a formação de aberrações cromossômicas e mitóticas e formar micronúcleos, em células das raízes de cebola.

Além de causar danos aos microtúbulos do fuso mitótico em vegetais superiores, o Cd é ainda um estressor para organismos aquáticos. De acordo com estudos de Almeida et al. (2001), que avaliaram o impacto causado às tilápias, após exposição ao cádmio, chegou-se a conclusão de que o Cd age como um estressor, uma vez que leva a alterações metabólicas, como: diminuição da atividade de algumas enzimas, como: fosfofruto quinase, lactato desidrogenase e creatina quinase, promovendo a diminuição da glicólise do tecido muscular; provoca também uma redução das concentrações de proteínas totais no fígado e na musculatura branca desses peixes.

O cobre (Cu) também é um elemento essencial aos organismos e a sua necessidade é regulada por mecanismos de controle homeostáticos. A toxicidade do cobre ocorre quando tais mecanismos de controle, dentro de um determinado compartimento, são sobrecarregados e/ou quando os mecanismos de reparo celular são deteriorados (PEDROZO; LIMA, 2001).

Bulbos de *A. cepa* tratados com sulfato de cobre (CuSO_4) e outros metais, em diferentes concentrações, resultaram em células portadoras de aderência cromossômica, baixa frequência de C-metáfases e uma diminuição dos valores obtidos para índice mitótico diretamente proporcional ao aumento das concentrações de CuSO_4 (FISKEJÖ, 1988). Esse mesmo autor pode concluir que o Cu foi o mais tóxico.

Quando presente em elevadas concentrações na água, o Cu é capaz de intoxicar os organismos aquáticos, uma vez que o alvo deste metal parece ser a homeostase do sódio, influenciando na absorção de cloretos e na excreção de compostos nitrogenados. Sua forma iônica geralmente é a mais tóxica (GROSSEL et al., 2002).

O ferro (Fe) é tido como elemento essencial para todas as formas de vida, uma vez que também é um componente chave na manutenção da homeostase celular. Inúmeros processos biológicos são intermediados por enzimas que requerem o ferro como co-fator (PEDROZO; LIMA, 2001). O excesso de ferro no ambiente pode estar associado à peroxidação lipídica das membranas e, conseqüentemente ao estresse oxidativo. Segundo Offer et al. (2005), a indução de lesões no DNA, tais como as quebras de fita dupla e aumento na frequência de micronúcleos foram descritos em indivíduos com alfa ou beta-talassemia, cujo estresse oxidativo exacerbado foi mediado pela presença de altas concentrações plasmáticas de ferro.

Estudos realizados por Rashed (2001), no lago Nasser (Egito), determinaram a concentração de alguns metais, dentre eles o Fe, em tecidos de tilápias, com o intuito de avaliar a poluição causada por tais metais. Foram observados elevados níveis de Fe nos tecidos do estômago destes peixes. A presença deste metal foi maior no estômago do que em outros tecidos. O autor sugere que o elevado índice de Fe neste lago seja decorrente de um aumento das descargas da agricultura nesta região, a qual inclui fertilizantes químicos e biocidas.

O mercúrio (Hg) é considerado um poluente de alto risco. A queima de combustíveis fósseis é considerada uma fonte de mercúrio. Estudos conduzidos em plantas e animais de laboratório mostraram que o mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, levando a uma distribuição anormal dos cromossomos e poliploidia. Esta ação resultaria da forte afinidade do mercúrio pelos grupos sulfidrilas encontrados nas proteínas do fuso (DE FLORA et al., 1994; CARDOSO et al., 2002).

Quanto à genotoxicidade do Hg, o efeito mais notável e consistente deste metal é a indução de C-metáfases, por meio do distúrbio da atividade do fuso, resultando na formação de células poliplóides ou aneuplóides (PATRA et al., 2004). Tais efeitos foram observados em estudos com *Hordeum vulgare* (PATRA et al., 2000).

Investigações realizadas com bulbos de *A. cepa*, tratados com cloreto de mercúrio (HgCl_2), demonstraram ainda que este metal foi capaz de produzir uma elevada frequência de células portadoras de aderência cromossômica neste vegetal (FISKEJÖ, 1988).

O Hg também é capaz de inibir os canais de água das membranas das células de vegetais superiores. Em concentrações maiores de 1mg/L, o Hg acelera a peroxidação lipídica das membranas, perturbando a sua integridade estrutural, aumentando a permeabilidade da membrana das sementes (MA, 1998).

3.3 O uso de *Allium cepa* como sistema-teste para o monitoramento ambiental

Testes citogenéticos são comumente aplicados no biomonitoramento da extensão da poluição e na avaliação dos efeitos combinados de substâncias tóxicas e mutagênicas, sobre os organismos no meio ambiente (MORAES, 2000).

O uso de vegetais superiores no diagnóstico e no monitoramento da poluição ambiental tem sido utilizado por diversos autores. Dentre esses vegetais, o *Allium cepa* (cebola) tem sido utilizado na determinação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de inúmeras substâncias (GRANT, 1994) e na de amostras ambientais complexas (COTELLE et al., 1999; GROVER; KAUR, 1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES; 2004; GRISOLIA et al., 2005; EGITO et al., 2007; SOUZA et al., 2008).

O uso de *A. cepa* como sistema-teste foi originalmente introduzido por Levan, em 1938, quando este autor demonstrou que a colchicina poderia causar distúrbios no fuso mitótico, levando a uma poliploidização das células meristemáticas das raízes de *Allium*. Mais tarde, este mesmo autor mostrou que diferentes soluções de sais orgânicos induziam diversos tipos de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (LEVAN, 1945). Desde então, adaptações na metodologia do teste de *A. cepa* têm sido realizadas, possibilitando uma avaliação e classificação mais abrangente de químicos, sendo eles misturas complexas, como o caso de grande parte das amostras ambientais, ou substâncias puras (FISKEJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1993; MA et al., 1995).

Além da sensibilidade na detecção dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, a espécie *A. cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste, graças às características que possui, como: conhecimento do seu ciclo celular; resposta à inúmeros mutágenos conhecidos; o rápido crescimento de suas raízes; o grande número de células em divisão; a sua alta tolerância às diversas condições de cultivo; a sua disponibilidade, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho, fator fundamental para estudos de avaliação de danos cromossômicos e/ou de distúrbios do ciclo de divisão celular, incluindo riscos de aneuploidia (FISKEJÖ, 1985; QUINZANI-JORDÃO, 1987; GRANT, 1994; EVSEEVA et al., 2003; EGITO et al., 2007).

As células meristemáticas de *A. cepa* constituem um material citogenético eficaz para analisar aberrações cromossômicas causadas pela poluição ambiental (KRISTEN, 1997). Com o uso de células meristemáticas, podemos quantificar uma série de parâmetros morfológicos e citogenéticos, incluindo a morfologia e o crescimento da raiz, a determinação do índice mitótico, a indução de micronúcleos e de metáfases, anáfases e telófases aberrantes (GRANT,

1994; EVSEEVA et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2006; EGITO et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

O teste de *A. cepa*, além de todas as vantagens mencionadas acima, tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos. Segundo Grant (1982), de 148 químicos avaliados pelo teste de *Allium*, 76% apresentaram respostas positivas, o que levou o autor a sugerir a inclusão deste teste como rotineiro de triagem para determinação de danos cromossômicos induzidos por químicos. De acordo com CHAUHAN et al. (1999), o *A. cepa* constitui um dos melhores sistemas-teste já estabelecidos, aplicados rotineiramente na avaliação do potencial genotóxico de químicos no ambiente, devido à sua boa correlação com outros sistemas-teste.

3.4 Teste de aberrações cromossômicas

As aberrações cromossômicas são tidas como importantes eventos decorrentes das ações genotóxicas de agentes químicos, aos quais diversos organismos estão expostos, inclusive o homem (NATARAJAN, 2002). Estudos epidemiológicos têm relacionado a elevada frequência de aberrações cromossômicas, na população humana, ao risco significativo de desenvolvimento de neoplasias (OBE et al., 2002).

Logo, uma das mais antigas ferramentas utilizadas no estudo de avaliação da genotoxicidade e mutagenidade é o teste de aberrações cromossômicas. Esse teste, baseado na citogenética convencional, é um dos poucos métodos diretos para mensurar alterações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002).

Devido à sua simplicidade, ao seu baixo custo, à sua versatilidade e às facilidades de aplicação, os testes de aberrações cromossômicas se tornaram indicados para a avaliação de agentes tóxicos e para o monitoramento da poluição (GROVER; KAUR, 1999).

O teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* fornece um rápido exame dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de químicos ambientais (GRANT, 1982; 1994; FISKEJÖ, 1985; 1988; RANK; NIELSEN, 1994; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; LEME; MARIN-MORALES, 2008). Este teste tem sido amplamente utilizado na avaliação de amostras ambientais complexas, tais como águas de rios (RANK; NIELSEN, 1998; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; EGITO et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008), lagos (GRISOLIA et al., 2005), esgotos industriais e domésticos (GROVER; KAUR, 1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004) e solos

contaminados (COTELLE et al., 1999; SOUZA et al., 2008). Dentre os químicos avaliados, o teste de *A. cepa*, foi eficiente na avaliação de inseticidas (BIANCHI, 2008; PEDRO, 2008), herbicidas (VENTURA, 2004; FERNANDES et al., 2007), corantes (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

As células meristemáticas das raízes de *A. cepa* podem quantificar uma série de parâmetros morfológicos e citogenéticos, incluindo a morfologia e o crescimento da raiz, a determinação do índice mitótico, bem como a indução de micronúcleos e de anormalidades no ciclo celular de células meristemáticas das raízes deste vegetal, como anáfases iniciais, C-metáfases, aderências cromossômicas, pontes e fragmentações cromossômicas. Estas alterações podem evidenciar ou até servirem como indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular (QUINZANI-JORDÃO, 1987; GRANT, 1994; VIDA KOVIĆ-CIFREK et al., 2002; EVSEEVA et al., 2003; EGITO et al., 2007).

Tal teste tem sido utilizado por diversos autores e constituem, portanto, eficientes e confiáveis ensaios para o monitoramento ambiental (FISKEJÖ, 1985; GRANT, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996; RANK; NIELSEN, 1997; STEINKELNER et al., 1998; COTELLE et al., 1999; HOSHINA, 2002; EVSEEVA et al., 2003; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; GRISOLIA et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006; EGITO et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

3.5 Peixes como organismos-teste e algumas considerações sobre a espécie *Oreochromis niloticus*

Segundo Souza et al. (2005) e Lemos et al. (2005), em ambientes aquáticos, vários organismos tais como, esponjas, moluscos, vermes bênticos, anfíbios e, principalmente os peixes, têm sido utilizados como bioindicadores de toxicidade de poluentes.

Os peixes reúnem ainda características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizados, pois alertam sobre o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental (POWERS, 1989).

Peixes e moluscos acumulam poluentes diretamente de águas contaminadas ou indiretamente pela ingestão de organismos contaminados, uma vez que desempenham diferentes papéis na cadeia trófica, sendo capazes de bioacumular, de forma direta, contaminantes dissolvidos na água (MINISSI et al., 1996).

Além de serem organismos-teste adequados para os estudos de genotoxicidade,

numerosas espécies de peixes constituem uma importante fonte de proteínas e de outros nutrientes na dieta humana. Os alimentos constituem a principal rota para exposição humana a substâncias tóxicas e peixes têm sido reconhecidos como os principais vetores de tais substâncias para humanos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Há um grande interesse, na literatura, sobre estudos referentes às neoplasias em peixes, uma vez que a incidência de tumores está correlacionada com altos níveis de exposição aos agentes mutagênicos e carcinogênicos no meio ambiente (HINTON et al., 1992; DEPLEDGE, 1996).

Logo, é de extrema importância o conhecimento dos efeitos dos poluentes despejados em cursos d'água, sobre o material genético desses animais, a fim de avaliar a potencialidade dessas substâncias em causar possíveis efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos (KLIGERMAN et al., 1975; HARSHBARGER; CLARK, 1990).

Teoricamente, uma espécie de peixe é tida como ideal para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade se apresentar os seguintes critérios: (1) ser largamente distribuída em vários ecossistemas; (2) sensível o bastante para detectar poluentes, mesmo em baixas concentrações; (3) adequada para trabalhos em laboratório; (4) permitir a captura de indivíduos, em populações naturais sem detrimento para a conservação da espécie (SANCHEZ-GALAN et al., 1998).

O gênero *Oreochromis* tem sido largamente utilizado na genética toxicológica (GRISOLIA; STARLING, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003). De acordo com Alves-Costa (2001), a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) constitui excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais, sendo, freqüentemente, utilizada para a investigação da toxicidade de contaminantes de ecossistemas aquáticos. De acordo com Vijayan et al. (1996), *O. niloticus* é reconhecida pela sua sensibilidade em responder, rapidamente, às alterações ambientais.

Oreochromis niloticus (Perciforme, Cichlidae) é um peixe de água doce, onívoro (STARLING, 1998), de origem africana, que foi introduzido no Brasil pelo Centro de Pesquisas Ictiológicas do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (D.N.O.C.S), em 1971, em alguns açudes do nordeste brasileiro. No ano de 1982, esta espécie foi introduzida na região sudeste do país (TANAKA, 2001).

É uma espécie de peixe comercialmente importante no Brasil, particularmente no estado de São Paulo, constituindo importante fonte de proteína (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003). Esta espécie é também comumente encontrada em estuários de todo o mundo, bem como no Lago Azul, objeto deste estudo.

3.6 Teste do Micronúcleo

Hoje, com o avanço das pesquisas e da ciência, existe uma infinidade de abordagens que podem ser utilizadas na identificação dos danos causados aos organismos expostos aos poluentes ambientais.

Para Heddle et al. (1983), uma das técnicas mais promissoras, baratas e rápidas para a avaliação genotóxica é o teste do micronúcleo. Micronúcleos são pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultantes de quebras cromossômicas ou aneuploidia durante a divisão celular (HEDDLE et al., 1983; AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001). Durante a telófase, o envoltório nuclear é formado ao redor do cromossomo inteiro ou do fragmento cromossômico perdido, que se descondensa e, gradualmente, vai assumindo a morfologia de um núcleo interfásico, com exceção do tamanho, pois este é bem menor que o núcleo principal, razão pela qual é chamado de micronúcleo (FENECH, 2000).

Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é comumente utilizada para se detectar danos no material genético, resultantes da exposição a um agente mutagênico (HEDDLE et al., 1983). Logo, o teste do micronúcleo tem se mostrado uma técnica promissora *in vivo* e *in vitro* para avaliar a mutagenicidade e a qualidade da água (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001).

O teste do micronúcleo não é considerado uma técnica vantajosa apenas pela simplicidade de análise de resultados, mas também pela possibilidade de aplicação em qualquer população celular, em proliferação, não sendo necessário o conhecimento cariotípico prévio do organismo-teste empregado (HAYASHI et al., 1998). Desta forma, o teste do micronúcleo foi, originalmente desenvolvido com a utilização de eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores, por Schmidt (1976), sendo mais tarde estendido para eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al., 1980). Desde então, modificações no teste do micronúcleo têm sido realizadas com o intuito de aplicá-lo aos mais diversos organismos-teste.

Atualmente, o teste do micronúcleo pode ser aplicado em bivalves (DAVID, 2007), vegetais superiores (FISKEJÖ, 1988; GRANT, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996; STEINKELNER et al., 1998; YI et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008), nas mais diversas espécies de peixes (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001; SOUZA; FONTANETTI, 2006; ERGENE et al., 2007), dentre outros.

O mecanismo de formação dos micronúcleos é o mesmo para todos os organismos. Em plantas, como *A. cepa*, o teste do micronúcleo é avaliado, em células da região F1 (região

não meristemática) ou ainda conjuntamente, com as aberrações cromossômicas, em células meristemáticas (MA et al., 1995; YI et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

O teste do micronúcleo tem sido aplicado, também com sucesso, em eritrócitos de peixes (HOSE et al., 1987; GRISOLIA; STARLING, 2001; SOUZA; FONTANETTI, 2006). Os eritrócitos de peixes são especialmente preferidos para este teste, pois sendo nucleados, os micronúcleos podem ser marcados facilmente como resultado de atividade clastogênica dos contaminantes. Assim sendo, este teste pode ser considerado como um indicador bastante sensível da exposição crônica a contaminantes aquáticos (AL-SABTI; METCLAFE, 1995; LEMOS et al., 2005).

Grisolia; Cordeiro (2000) investigaram os padrões de sensibilidade intra e inter específico, na indução de micronúcleos, em três espécies de peixes, *Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*, por quatro clastógenos conhecidos: bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracil e mitomicina C. Os autores observaram que a frequência de micronúcleos, induzidos pela ciclofosfamida, foi significativamente maior que seus respectivos controles, para as três espécies de peixes. Este clastógeno também foi o mais efetivo. Nenhuma diferença na frequência de micronúcleos foi observada entre as espécies.

O teste do micronúcleo foi aplicado ainda, nessas mesmas espécies de peixes, para avaliar a capacidade da descarga de duas estações de tratamentos de águas, que são lançadas no lago Paranoá (DF), de induzir danos genéticos nesses organismos, em estudos realizados por Grisolia; Starling (2001). Os autores observaram que não houve diferenças significativas nas frequências de micronúcleos entre o controle e as áreas hipertróficas do lago.

Uma análise comparativa entre o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes e de roedores foi conduzido, utilizando a ciclofosfamida, a mitomicina C e alguns pesticidas. A ciclofosfamida e a mitomicina C induziram a formação de micronúcleos em ambos os sistemas-teste. Este estudo revelou ainda que o teste do micronúcleo, em peixes, pode ser utilizado na avaliação da genotoxicidade (GRISOLIA, 2002).

Os efeitos genotóxicos do efluente de uma indústria têxtil também foram mensurados, por meio do teste do micronúcleo e de técnicas para analisar regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR), em tilápias, em estudos desenvolvidos por Çavas; Ergene-Gözükara (2003). Os peixes foram expostos a três diferentes concentrações dos efluentes, por três, seis e nove dias. A frequência de micronúcleos foi examinada em eritrócitos do sangue periférico e em células de brânquias. Os autores obtiveram como resultado, um aumento dose-dependente na frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares nos eritrócitos do sangue periférico. A frequência de micronúcleos em células branquiais também aumentou

significativamente, enquanto que os parâmetros de AgNOR diminuíram. Estudos têm mostrado que mudanças específicas das características nucleolares em células de peixes podem ser utilizados para a avaliação da toxicidade.

A avaliação dos efeitos mutagênicos causados por efluentes de uma refinaria de petróleo e de uma estação de processamento de cromo foram avaliados, por meio do teste do micronúcleo, em eritrócitos de *O. niloticus* (ÇAVAS; ERGENE GÖZÜKARA, 2005). Os resultados deste estudo mostraram que ambos os efluentes possuíam potencial genotóxico. Por outro lado, os níveis de danos genéticos induzidos pelos efluentes da refinaria de petróleo foram, consideravelmente, maiores do que os efluentes da estação de processamento de cromo. Os autores sugerem ainda que, além dos micronúcleos, as anormalidades nucleares (como núcleos do tipo blebed e lobed) também podem ser utilizadas como possíveis indicadores de danos genotóxicos.

O teste do micronúcleo também foi aplicado em eritrócitos de *Astyanax bimaculatus* e *Hoplias malabaricus*, coletados em dois sítios do rio Japaratuba (Sergipe), uma área impactada por um complexo de indústrias petroquímicas (PANTALEÃO et al., 2006). Os autores compararam as respostas dos peixes desta área impactada com os de uma área de referência, rio Jacarecica, também em Sergipe. Os resultados obtidos indicaram um aumento na frequência de micronúcleos de *A. bimaculatus*, das amostras do rio Japaratuba, quando comparado aos resultados obtidos com *A. bimaculatus*, do rio Jacarecica. *H. malabaricus*, coletados nos sítios da área impactada, não apresentaram uma diferença significativa na frequência de micronúcleos. Os autores, então, confirmam a eficácia do teste do micronúcleo na detecção de contaminantes químicos no ambiente aquático e validam o teste para o monitoramento *in situ* da qualidade da água. Demonstram também que, *A. bimaculatus* é mais sensível que *H. malabaricus* na indução de micronúcleos.

Souza; Fontanetti (2006) avaliaram, por meio do teste do micronúcleo e alterações nucleares, a capacidade das águas do rio Paraíba do Sul, uma área influenciada por efluentes de uma refinaria de petróleo, causar danos genéticos em eritrócitos de *O. niloticus*. Este trabalho detectou a presença de substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico, bem como de substâncias citotóxicas, nas águas desse rio.

Ergene et al. (2007) avaliaram a frequência de anormalidades nucleares, micronúcleos e brotos nucleares, no sangue periférico de três espécies de peixes: *Clarias gariepinus*, *Alburnus orontis* e *Mugil cephalus* das lagoas de Akgol e Paradeniz, pertencentes ao Delta Goksu (Turquia). As concentrações de metais pesados também foram mensuradas em amostras de água e sedimento. Os resultados deste estudo indicam que as lagoas do Delta

Goksu estão contaminadas com poluentes genotóxicos e essa potencialidade está relacionada às atividades de agricultura e de descargas urbanas ou industriais.

Em eritrócitos de peixes, além da análise de micronúcleos, outras anormalidades nucleares podem ser observadas; Carrasco et al. (1990) classificaram essas anormalidades segundo seu aspecto como: “blebbed”, “lobed”, “notched” e “broken-egg”. Alguns autores sugerem que essas anomalias devem ser contabilizadas concomitantemente à análise de micronúcleos. O problema em contabilizar essas alterações existe, pois não há um consenso sobre o tipo de irregularidades da morfologia nuclear que podem ser consideradas análogas ao micronúcleo, isto é, resultantes da ação de um agente mutagênico, uma vez que os mecanismos da formação de tais lesões ainda não estão totalmente esclarecidas (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

Carrasco et al. (1990) não encontraram correlações significativas entre as alterações encontradas, incluindo o micronúcleo e as áreas poluídas estudadas. Os autores concluíram que o teste do micronúcleo pisceo é altamente questionável em estudos biológicos *in situ* e que as lesões nucleares observadas durante o estudo não possuíam origem mutagênica, como resultado da exposição à contaminantes.

Para contradizer os estudos de Carrasco et al. (1990), De Flora et al. (1991; 1993) indicou a utilização do teste do micronúcleo pisceo como biomarcador precoce de poluição ambiental. Deste modo, a frequência das alterações da morfologia nuclear e de micronúcleos, vem sendo utilizada por vários autores para esta finalidade (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; BOMBAIL et al., 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

3.7 Ensaio do cometa

Outro teste utilizado com eficiência no biomonitoramento ambiental é o ensaio do cometa, que avalia danos em células em proliferação ou não, *in vivo* ou *in vitro* (MONTEITH; VANSTONE, 1995).

O ensaio do cometa, ou eletroforese em gel de célula única, é um método de estudo genotoxicológico sensível, que avalia danos ao DNA de células individualizadas. Este ensaio combina a simplicidade de técnicas bioquímicas para detecção de quebras de fita simples de DNA e/ou sítios álcali-lábeis com as abordagens típicas dos ensaios citogenéticos em células individualizadas (HARTMANN; SPEIT, 1997; SOUZA et al., 2005). É considerado um teste sensível, rápido e eficiente. Comparado com outros testes de genotoxicidade, as vantagens do ensaio do cometa consistem na detecção de pequenos danos no DNA, requerimento de

pequeno número de células, flexibilidade, precisão, fácil aplicação, reprodutibilidade e curto período de tempo para a realização do experimento (BELPAEME et al., 1998; TICE et al., 2000; BÜCKER et al., 2006).

O desenvolvimento da técnica se deve, principalmente, aos trabalhos de Östling; Johanson (1984), pela metodologia de eletroforese do DNA em micro-gel, e a de Singh et al. (1988), que aperfeiçoaram a técnica, atribuindo-lhe maior sensibilidade com o uso de solução alcalina. Atualmente, muitos grupos de pesquisadores internacionais têm publicado normas e critérios para a realização do ensaio, com o objetivo de estabelecer protocolos de alta qualidade, para obter dados válidos, reprodutíveis e fidedignos (KLAUDE et al., 1996; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; DI-PAOLO, 2006).

O ensaio do cometa tem sido aplicado, com sucesso, em eritrócitos de várias espécies de peixes, destacando a sensibilidade das células sangüíneas destes animais aos efeitos genotóxicos (PADRANGI et al., 1995; BELPAEME et al., 1998; GONTIJO et al., 2003).

Mitchelmore; Chipman (1998) listam uma série de estudos desenvolvidos utilizando o ensaio do cometa, em diferentes organismos aquáticos. Neste trabalho, os autores discutem as vantagens e desvantagens da utilização deste ensaio, comparando-o com outras técnicas para detecção de quebras na fita de DNA, além de discutir a aplicabilidade do ensaio em estudos de monitoramento ambiental. Os autores concluíram que este ensaio deve ser realizado com cautela, para que não ocorram erros de interpretação e, ainda, que o ensaio merece estudos para detecção de variabilidade entre indivíduos e células expostos aos poluentes e aos estímulos genotóxicos naturais.

Gontijo et al. (2003) também aplicaram o ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, a fim de avaliar a possível modulação dos resultados da benzocaína, nos eritrócitos expostos a dois mutágenos conhecidos, o metilmetano sulfonato e o peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos sugerem que o anestésico não influencia nos resultados, sendo recomendado, devido ao bem estar proporcionado ao animal, por evitar o estresse.

Estudos ecotoxicológicos foram realizados, no porto de Göteborg, na Suíça, a fim de avaliar o impacto biológico da contaminação aquática do local, após um derramamento de petróleo, no ano de 2003 (FRENZILI et al., 2004). O ensaio do cometa foi aplicado em eritrócitos de enguias, *Zoarces viviparus*, coletadas na área impactada e em um sítio de referência. Metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) também foram analisados na bile desses peixes. Os resultados obtidos pelos pesquisadores mostraram um alto nível de danos no DNA e, paralelamente, um pico de metabólitos de HPAs na bile dos

peixes da área impactada.

Bücker et al. (2006) avaliaram o potencial genotóxico e mutagênico do benzeno, por meio do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo, em peixes elétricos (*Eingenmannia virescens*), expostos a 50 ppm deste composto, por diferentes tempos de exposição. Pelo teste do micronúcleo não foi possível detectar efeitos mutagênicos nos eritrócitos analisados; em contrapartida, os resultados obtidos pelo ensaio do cometa sugerem ação genotóxica do benzeno, devido a um aumento progressivo no número de células com as maiores classes de danos, de acordo com o gradual aumento dos tempos de exposição, indicando um efeito tempo-dependente. Os autores concluem ainda que o ensaio do cometa é mais sensível que o teste do micronúcleo.

Souza; Fontanetti (2007) utilizaram eritrócitos de *O. niloticus* no ensaio do cometa para avaliar a possível genotoxicidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. Pelos resultados obtidos, a autora concluiu que havia a presença de substâncias com potencial genotóxico nas águas do rio, uma vez que observou um aumento nos nucleóides pertencentes às classes 2 e 3, em todos os meses de coleta.

Para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de diferentes concentrações do herbicida atrazina, Ventura et al. (2008), aplicou o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, em eritrócitos de *O. niloticus*. Os autores observaram que as diferentes concentrações do herbicida mostraram-se capaz de induzir uma alta frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares, no teste do micronúcleo e também, resultados significativamente diferentes, no ensaio do cometa, para as três concentrações testadas. Pelos dados obtidos, os autores concluíram que o herbicida atrazina pode ser extremamente danoso aos organismos expostos a ele.

3.8 Ecossistemas lênticos como modelo de estudo

Segundo Margalef (1983) designam-se sob o nome de lagos, massas de água que alcançam certa profundidade mínima, suficiente para o estabelecimento de uma estratificação térmica, ao menos em certos períodos do ano. São ainda corpos d'água interiores, sem comunicação direta com o mar e suas águas têm, em geral, baixo teor de íons dissolvidos, quando comparadas às águas oceânicas (ESTEVES, 1998).

Ainda de acordo com Esteves (1998), o lago não é um ecossistema fechado nem permanente. Os lagos surgem e desaparecem no decorrer do tempo, graças a vários fenômenos, dentre os quais os mais importantes são: o seu próprio metabolismo como, por

exemplo, o acúmulo de matéria orgânica no sedimento e a deposição de sedimentos transportados por seus afluentes, bem como poluentes das regiões urbanizadas ou cultivadas.

De acordo com Odum (1988), os lagos, lagoas e os tanques são, convenientemente, considerados ecossistemas de águas paradas ou lênticos. Alguns caracteres biológicos dos lagos estão relacionados com características fáceis de serem apreciadas, como o fluxo e o tempo de renovação da água, a extensão de sua bacia e a sua profundidade (MARGALEF, 1983).

Dependendo das suas características hidráulicas, o lago apresenta grande instabilidade limnológica. Seus compartimentos são divididos em: região litorânea, região limnética ou pelágica, região profunda e interface água-ar. Essa classificação tem caráter didático, uma vez que estes compartimentos não estão isolados dentro do ecossistema aquático, mas em constante interação, por meio de trocas de matéria e energia, superpondo-se muitas vezes (ESTEVES, 1998).

A formação de grandes aglomerados urbanos e industriais, com crescente necessidade de água para o abastecimento, irrigação, navegação, produção de energia elétrica e lazer, faz com que hoje, quase todas as atividades estejam cada vez mais dependentes da disponibilidade de água. Logo, a conservação dos ecossistemas aquáticos, visando sua utilização racional, tem sido um dos aspectos centrais de muitos estudos de monitoramento ambiental, através de inúmeras metodologias, uma vez que conservar estes ambientes significa manter suas condições naturais, para que possam ter seus múltiplos usos garantidos (ESTEVES, 1998; MORAES; JORDÃO, 2002).

As características ecotoxicológicas de lagos são de difícil caracterização e interpretação. Assim sendo, os lagos foram distinguidos em 76 tipos considerando diversos fatores (químicos, físicos, biológicos), relacionados à geologia da região onde ocorrem (MARGALEF, 1983; ESTEVES, 1998). Na literatura científica, poucos são os trabalhos relacionados aos lagos, quando comparados com os de outros ambientes, como rios.

No lago Nasser, no Egito, estudos determinaram a concentração de metais pesados em tecidos de tilápias (*Tilapia nilotica*), uma espécie comum deste lago, com o intuito de avaliar a poluição causada por tais metais (RASHED, 2001).

Em Brasília (DF), Grisolia; Starling (2001) avaliaram por meio do teste do micronúcleo em eritrócitos de *Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*, a possível presença de mutágenos nas áreas do Lago Paranoá, cujas áreas recebem descargas diretas das estações de tratamento de esgoto municipal.

Com o objetivo de analisar o potencial citotóxico e genotóxico das águas superficiais

de um lago artificial recente, denominado Lago do Ônibus, no Rio Grande do Sul, Buttow et al. (2004), por meio do sistema-teste de *A. cepa*, detectaram as potencialidades de citotoxicidade e genotoxicidade das águas deste lago, pois evidenciaram alterações no sistema-teste empregado.

Lemos et al. (2005) utilizaram o ensaio do cometa em *Tilapia rendalli*, a fim de conduzir uma avaliação ambiental do Lago Igapó II, localizado na região metropolitana de Londrina-PR. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras de água do lago possuíam um número significativamente alto de cometas pertencentes às maiores classes, indicando genotoxicidade no ambiente.

Estudos para medir as concentrações de mercúrio total foram realizados nas águas e nos peixes dos Lagos Manágua e Apoyo, na Nicarágua. Os autores observaram que as concentrações de mercúrio do lago Manágua eram 10 vezes maiores que a do lago Apoyo. As concentrações de mercúrio em peixes nativos não foram significativas, apenas uma das quatro espécies comerciais de tilápias do lago Manágua excedeu o limite máximo dos níveis de mercúrio, para o consumo humano. Portanto, os autores recomendam o monitoramento do mercúrio nas espécies de peixes destinadas ao comércio e ao consumo humano (McCRARY et al., 2006).

Olivella (2006) mensurou 14 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em um lago subalpino (lago Maggiore), no norte da Itália, no período de julho de 2003 e janeiro de 2004. O autor coletou águas pluviais e águas superficiais do lago e pôde observar que houve uma variabilidade temporal das concentrações de HPAs nas águas pluviais e nas superficiais. As maiores concentrações de HPAs, nas águas superficiais do lago, foram encontradas nos meses de novembro e dezembro, coincidindo com os meses de chuva. O autor pôde concluir que a chuva era a principal fonte de contaminação do lago, por HPAs.

Oberholster et al. (2008) realizaram bioensaios com crustáceos, cnidários, alface, cebola e anfíbios, na área da reserva natural do lago Rietvlei, no sul da África. Os autores observaram alta taxa de letalidade, em todas as amostras de águas coletadas, pelos sistemas-teste utilizados. Concluíram que a deteriorização da reserva se dá, possivelmente, por fatores como o aumento da urbanização e da industrialização nesta área.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Produção Sustentável e Direito Ambiental-IBPS (2006), o fundo da Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio de Janeiro, está contaminada com metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), substância derivada de óleos lubrificantes e do petróleo, que podem ser cancerígenas. Acredita-se que a poluição, que está acima dos níveis recomendados, possa chegar aos peixes, siris e caranguejos. Suspeita-se

que esta contaminação esteja sendo provocada pelos postos de gasolina e por veículos que circundam a região.

Logo, os problemas decorrentes da redução da qualidade da água para o abastecimento, assim como para as demais finalidades, têm recebido especial atenção. Assim, investigações que possam colaborar na melhoria da água utilizada pela população, pela identificação das fontes poluidoras, proposições para sua eliminação e contribuição para a estabilidade do ecossistema e para o estabelecimento de critérios biológicos, físicos e químicos para o controle da água, são de extrema importância.

3.9 Caracterização da área de estudo e padrões de qualidade de água para a saúde pública – classificação das águas segundo Resolução 357/2005 (CONAMA).

O Lago Azul é um ecossistema lântico (Figura 1), pertencente à cidade de Rio Claro, interior do estado de São Paulo. Localiza-se entre as coordenadas 22° 23' 25.79''S e 47° 33' 48.01''W. Hoje, este ecossistema possui uma área de 3,56 hectares, com uma profundidade que varia de 20 cm a 1,80 m. Foi construído em 1970, pelo represamento do córrego da Servidão, a fim de contribuir com a drenagem e a regularização do percurso do mesmo, buscando evitar enchentes nesta região da cidade (TANAKA, 2001), uma vez que as águas vindas das ruas dos bairros situados à montante dessa área traziam muitos sedimentos (terra, lixo e entulho), contribuindo para o assoreamento do córrego.

De acordo com o administrador do lago, a nascente do córrego da Servidão situa-se no bairro Jardim Portugal e, provavelmente, esteja destruída devido à construção do bairro residencial. Segundo Tanaka (2001), problemas de inundação, infiltração, erosão e contaminação das águas por esgoto ocorrem em diferentes pontos do córrego e também no lago, mesmo depois da canalização.

Por situar-se em um fundo de vale, recebe toda a carga pluvial da maioria dos bairros da cidade. Em comunicações pessoais, descobrimos que por período indeterminado, recebeu efluentes não tratados de uma lavanderia industrial e esgotos clandestinos, embora essa afirmação seja negada pelos órgãos municipais. Acredita-se que, por escoamento de águas pluviais, recebe também substâncias derivadas de gasolina e álcool, devido à presença de vários postos de combustível ao seu entorno.



Figura 1. Localização do Lago Azul, na cidade de Rio Claro-SP. (Fonte: RIO CLARO. Prefeitura Municipal, 1990 apud MOITA, 2007). Desenho modificado por Arnaldo Rosalém, com organização de Luciana Rossi Moita, 2007.

Atualmente, a área que margeia o Lago Azul apresenta 110.000 m² de área verde, que serve como área de recreação e lazer, possui quadras poliesportivas, parques, pistas para caminhadas, além da prática de atividade pesqueira. A pesca foi proibida pela Prefeitura Municipal de Rio Claro, no ano de 2005.

De acordo com a resolução nº357 de 17 de março de 2005, do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), que dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, estabelecendo as condições e padrões de lançamento de efluentes, as águas doces são classificadas, de acordo com seus usos preponderantes, em até cinco classes.

Por esta classificação, o Lago Azul está inserido na classe 2. Para esta classe, as águas podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; à aquicultura e à atividade de pesca.

De acordo com o laudo of-098/CEI, da CETESB, de 29 de agosto de 2006, como o Lago Azul é um corpo d'água pertencente à classe 2, deveria se enquadrar dentro dos parâmetros estabelecidos e, como tal, de acordo com os resultados obtidos por tal laudo, o lago encontra-se fora de sua classificação, atendendo somente aos parâmetros de nitrogênio (nitrato/nitrito) e oxigênio dissolvido, conquanto o oxigênio direto apresenta-se elevado, devido a intensa formação de algas. Segundo este mesmo laudo, os parâmetros que desenquadram o referido lago desta classificação são, essencialmente, devido ao lançamento de esgotos clandestinos nas galerias pluviais, que adentram ao lago.

Frente à problemática exposta, torna-se necessário um estudo de biomonitoramento das águas deste lago, uma vez que este compreende uma importante área de lazer, recreação e pesca. Soma-se a isto, o fato da comunidade que consumia os peixes ali obtidos, apresentarem problemas de saúde, levando à proibição da pesca pela Prefeitura Municipal de Rio Claro no de 2005, segundo indicativos ambientais da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB (Piracicaba-SP).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais biológicos

Para a realização dos bioensaios foram utilizados dois organismos-teste. Sementes de mesma variedade de *Allium cepa* (Liliaceae), popularmente conhecida como cebola baia piriforme, de mesma marca, lote e prazo de validade, a fim de evitar diferentes respostas às diversas etapas dos testes.

Peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo, também foram utilizados para este estudo. No total foram utilizados 60 indivíduos com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes foram oriundos de piscicultura (UNESP - Campus de Rio Claro).

4.2 Localização da área de estudo e coleta das amostras de água

A água utilizada no presente trabalho foi coletada no Lago Azul (Figura 2), localizado no município de Rio Claro – SP, cuja área é influenciada por tributários pluviais. As coletas foram realizadas em agosto de 2006, março e agosto de 2007 e fevereiro de 2008.

Com o auxílio de um barco, adentramos ao lago e coletamos a água em 3 pontos distintos. Foi feita a mistura das águas coletadas nos próprios recipientes de coletas. Após a coleta das amostras, a água foi levada ao Departamento de Biologia, da UNESP de Rio Claro, para a montagem dos bioensaios.



Figura 2. Lago Azul, Rio Claro-SP: Local de coletas de águas: A: vista panorâmica do Lago Azul (imagem de satélite, obtida pelo Google Earth®); B: tributário pluvial.

4.3 Análise físico-química da água

Dados referentes ao pH, DBO, DQO, sólidos totais dissolvidos, condutividade elétrica, carbono orgânico total (COT), nitrito, nitrato, turbidez e dos metais Ag, Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Na, Ni, Pb, e Zn foram obtidos utilizando a metodologia USEPA, para as coletas de agosto/2007 e fevereiro/2008, pelo laboratório ASL Análises Ambientais, da cidade de Rio Claro.

4.4 Bioensaios

4.4.1 Bioensaios com *A. cepa*

Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em águas oriundas do Lago Azul, à solução de 10 µL/mL de metilmetanosulfonato[®] (CAS N°66-27-3) e a 0,84 ppm de trifluralina[®] (CAS N°1582-09-8), para controles positivos e em água ultra pura, para controle negativo.

Os ensaios foram realizados em placas de Petri, contendo, aproximadamente, 100 sementes. As sementes permaneceram nessas placas até atingirem 2 cm de comprimento - tratamento contínuo. Decorrido este tempo, foram coletadas algumas raízes de cada ensaio e o restante delas foi transferido para placas contendo água ultra pura, por um período de recuperação de 48 horas, quando foram realizadas novas coletas das raízes, para a confecção de lâminas e posterior análise citogenética.

A fixação das raízes foi feita em Carnoy 3:1 (3 partes álcool etílico PA : 1 parte de ácido acético glacial PA) por 6 h, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram conservadas em geladeira, até sua utilização.

Para realizar as análises citológicas, as raízes foram submetidos a uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C, durante 9 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Logo após, foram colocadas em reativo de Schiff, por duas horas. Na confecção das lâminas, utilizou-se Carmim Acético 2%. Este corante é usado como contra-corante e também para facilitar o espalhamento das células. Todas as lâminas foram obtidas, submetendo os meristemas radiculares a um esmagamento suave entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas foram montadas em Permount, para serem posteriormente observadas.

Foram analisadas 1000 células meristemáticas de *A. cepa* por lâmina (totalizando cerca de 5.000 células para cada tratamento), para se determinar e comparar as frequências de

células interfásicas, mitóticas e em processo de morte celular. A análise estatística dos dados foi feita pelo método de Mann-Whitney.

Para a obtenção dos índices mitóticos, foram consideradas as porcentagens das células em divisão e das células em intérfase, seguindo a aplicação da fórmula a seguir:

$$\text{I.M. (índice mitótico)} = \frac{\text{n.º de células em divisão}}{\text{n.º total de células observadas}} \times 100$$

Para a obtenção dos índices de morte celular foram consideradas as porcentagens das células em processo de morte de celular, seguindo a aplicação da fórmula abaixo:

$$\text{I.M.C (índice de morte celular)} = \frac{\text{nº de células em morte celular}}{\text{nº total de células observadas}} \times 100$$

4.4.2 Bioensaios com *O. niloticus*

Foram utilizados três aquários, com capacidade de 20L cada; dois aquários continham águas oriundas de um poço artesiano, para controles positivo e negativo e, um terceiro aquário, águas provenientes do Lago Azul, mantidas em aeração por 48 h, em sala com temperatura de 20 a 23°C, antes do início do experimento. Após este tempo, cinco peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente como tilápia-do-Nilo, obtidos do tanque de piscicultura do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, foram inseridos em cada aquário. Os peixes não foram alimentados durante o experimento e ficaram expostos ao fotoperíodo correspondente às respectivas estações (agosto: inverno; fevereiro e março: verão), sob constante aeração. Em março de 2007, conseguimos padronizar o controle positivo, por isso, os dados de agosto de 2006 seguem sem resultados para controle positivo. Para o controle negativo, os peixes foram expostos a injeções intra-peritoniais de soro fisiológico (30 mL de soro/50 g de peixe) por 96 h. Para o controle positivo, os peixes foram expostos a injeções intra-peritoniais de ciclofosfamida (20mg/mL), com aplicações de 30 mL de ciclofosfamida/50 g de peixe, também por 96 h.

4.5. Teste do Micronúcleo

De cada peixe vivo retirou-se aproximadamente 0,3 mL de sangue, através de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas, a fim de evitar a coagulação do sangue coletado.

Após a punção, limpou-se a agulha com papel absorvente, com o intuito de evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e/ou muco.

A primeira gota foi descartada para evitar à contaminação do sangue, sendo utilizadas as gotas posteriores para a confecção das lâminas, obtidas por meio da técnica de esfregaço sangüíneo.

Três extensões sangüíneas foram realizadas para cada indivíduo. O material foi fixado em etanol absoluto por 10 minutos. Após 24 horas, as lâminas foram submetidas à reação de Feulgen, com uma hidrólise ácida de 11 minutos, em banho-maria, à 60°C.

4.5.1 Análise dos resultados

Para cada peixe foram analisados 3.000 eritrócitos, sob objetiva de imersão (100x), para a determinação da frequência de células micronucleadas.

Na identificação de micronúcleos, alguns critérios foram adotados, segundo Huber et al. (1983): boa preservação e coloração do citoplasma e do núcleo; micronúcleo e o núcleo principal dentro do mesmo citoplasma; ausência de conexão entre núcleo e micronúcleo; o diâmetro máximo do micronúcleo não deve ultrapassar a metade do núcleo; manutenção da esfericidade do núcleo e micronúcleo.

Considerou-se também a presença de anormalidades nucleares, segundo a classificação de Carrasco et al. (1990) como:

- “blebbed nuclei”, que corresponde a uma evaginação relativamente pequena do envoltório nuclear, o qual aparenta conter eucromatina ou, algumas vezes, heterocromatina.
- Os “broken eggs” podem estar unidos ao núcleo da célula principal por uma estrutura nucleoplasmática;
- “lobed nuclei”, correspondendo a núcleos com evaginações maiores, mas sem a mesma delimitação. Alterações morfológicas do núcleo foram incluídas nesta categoria, por exemplo, aumento da superfície nuclear, formando múltiplos lóbulos, caracterizando um núcleo disforme;
- “notched nuclei”, descrito como uma invaginação da membrana. Ainda de acordo com este autor, núcleos “notched” parecem não conter material nuclear no local invaginado. As anormalidades descritas por Carrasco et al. (1990) foram conjuntamente consideradas para a análise estatística.

4.5.2 Análise Estatística

Para o teste estatístico foi utilizada uma comparação dos resultados de cada grupo de tratamento, através do teste de Kruskal-Wallis.

4.6 Preparação das lâminas para ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi conduzido segundo Singh et al. (1988) e Vilella et al. (2006), com algumas modificações, descritas a seguir: as lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5%. Por meio de punção cardíaca, com seringas heparinizadas, retirou-se 0,3 mL de sangue dos peixes. O ensaio foi realizado em triplicata, para de março/2007, para posterior averiguação da influência de diferentes pHs e colorações. Para as demais coletas, adotou-se pH=12,1.

Após a punção cardíaca, 5 μ L do sangue foram diluídos em 1000 μ L de PBS. Sobre as lâminas pré-gelatinizadas foram gotejadas 10 μ L da suspensão celular misturadas a 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5%, à 37°C, cobertas com lamínula e colocadas no refrigerador, por 5 minutos, para solidificação do gel. As lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas à solução de lise recém preparada (1 mL de triton-X 100, 20 mL de DMSO e 79 mL de solução lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0-10,5) por no mínimo uma hora e no máximo duas horas, à 4°C. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese. Para as duas primeiras corridas, adicionou-se tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 12,1) por 20 minutos. Decorrido o tempo de relaxamento, submeteu-se as lâminas à eletroforese por 15 minutos à 21V e 270mA (0,8V.cm⁻¹); e para a última corrida, seguiu-se a mesma metodologia, porém com tampão alcalino (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH>13). Toda a metodologia acima foi conduzida sob luz indireta.

Ao término da eletroforese, as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba. A neutralização foi feita em três banhos de 5 minutos com tampão neutro (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5), para a remoção de sais e detergentes, secas à temperatura ambiente.

4.6.1 Coloração por brometo de etídio

Para a coloração por brometo de etídio, as lâminas foram fixadas em etanol 100%, por 10 minutos, sendo acondicionadas à temperatura ambiente para a secagem. As lâminas foram coradas com solução aquosa de brometo de etídio (0,02mg/ml) no momento da análise, realizado sob microscópio de fluorescência (Leica DMLB), filtro B-3⁴ (excitação: λ = 420 nm; barreira: λ = 520 nm), em objetiva de 1000x.

4.6.2 Coloração por prata

Para a coloração por prata, as lâminas foram cobertas por uma solução de fixação (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5%, glicerol 5%), por 10 minutos, em uma cubeta vertical, lavadas por três vezes em água destilada e colocadas para secar em temperatura ambiente até o dia seguinte. Logo após, foram rehidratadas por 5 minutos em água destilada e em seguida, coradas por 36 mL de solução A (carbonato de sódio 5%) e 54 mL de solução B (nitrato de amônia 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido silicotungstico 0,25%, formaldeído 0,15%, recém preparado e no escuro) sob constante agitação a 37°C, por 10 minutos ou até as lâminas atingirem coloração entre o cinza ou marron. Após a coloração, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e submetidas à solução stop (ácido acético 1%), por 5 minutos e lavadas novamente, por três vezes, em água destilada e deixadas a secar em temperatura ambiente, posteriormente sendo analisadas em microscópio de luz, em objetiva de 40x.

4.6.3 Análise das lâminas e estatística

Para a análise das lâminas foram observados 100 cometas por lâmina, utilizando a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA do núcleo, segundo Rigonato et al. (2005). Os cometas obtidos foram classificados em quatro classes: classe 0 (sem dano), classe 1 (pouco dano – nucleóides apresentando um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça), classe 2 (dano médio – nucleóides apresentando um tamanho de cauda equivalente a uma ou duas vezes o tamanho do diâmetro da cabeça) e classe 3 (dano intenso – nucleóides apresentando o tamanho da cauda superior a duas vezes o diâmetro da cabeça). Os dados foram apresentados como frequência de células com dano, a distribuição de classes e o escore de dano, calculado como a soma do número de células em cada classe e o total da classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3). Logo, os escores podem variar de zero (todas as células sem dano - 0x100) a 300 (todas as células com dano máximo 3x100), segundo Rigonato et al. (2005). A análise estatística foi realizada utilizando o método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

4.7 Dados meteorológicos da região

Dados climatológicos referentes aos meses de coleta de amostras de água do Lago Azul, foram obtidos junto ao Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA), da UNESP de Rio Claro. Os dados levantados foram: média mensal das temperaturas mínima e máxima, umidade relativa do ar, precipitação total e número total de dias chuvosos.

5. RESULTADOS

5.1. Dificuldades encontradas

As amostras de águas coletadas no lago foram utilizadas em ensaios biológicos, com o intuito de estimar uma possível contaminação, demonstrada pelo potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dessas águas, utilizando dois organismos-teste. Durante a realização deste estudo foram produzidos três artigos. No presente trabalho foram avaliados parâmetros físico-químicos e de metais, para as amostras de águas do lago estudado, nas coletas de agosto/2007 e fevereiro/2008. Assim sendo, os resultados das análises físico-químicas foram apresentadas e discutidas nos artigos. Devido a problemas metodológicos com o organismo-teste de *O. niloticus*, os resultados obtidos nas coletas de agosto/2006 e fevereiro/2008 não foram incluídas nos artigos.

5.2. Problemas com o sistema-teste de *Oreochromis niloticus*

Problemas com o controle positivo para peixes ocorreram para a coleta de agosto/2006. Esse controle só foi padronizado a partir da coleta de março/2007. Assim, apresentamos separadamente os dados obtidos na amostra de agosto/2006, para micronúcleos e anormalidades nucleares (tabelas 1 e 2) e os dados obtidos para o ensaio do cometa, na tabela 3.

Pela análise da tabela 1, observa-se que não há diferença estatisticamente significativa de eritrócitos micronucleados, para a amostra de águas do lago, comparado ao controle negativo (figura 1). Ao contrário dos resultados obtidos pela análise de micronúcleos, na coleta de águas do mês de fevereiro/2008, devido a problemas metodológicos ocorridos com a coloração feita por prata no ensaio do cometa, não foi possível analisar os resultados obtidos. Logo, os resultados do teste do micronúcleo e de anormalidades nucleares, seguem nas tabelas 1 e 2.

Quanto à frequência de micronúcleos, foram observadas diferenças significativas nas amostras de águas do lago, na coleta de fevereiro/2008 (tabela 1, figura 1). No entanto, a frequência de alterações nucleares, na amostra de águas do lago, não foi significativa pelo método estatístico de Kruskal-Wallis (tabela 2, figura 2). Para esta coleta, também foi possível observar uma elevada frequência de células em processo de morte celular (tabela 2).

Tabela 1. Distribuição dos valores obtidos para micronúcleos, em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 96, às águas de um ambiente lântico. Coletas: agosto/2006 e fevereiro/2008.

Coletas	Pontos	Total de eritrócitos analisados	Número total de MN observados	Média e desvio padrão	Frequência (%) de MN observados
Agosto/2006	CN	15000	5	1±0,7	0,03
	LA	15000	9	1,8±0,44	0,06
Fevereiro/2008	CN	15000	0	0	0
	LA	15000	21	4,2±1,7*	0,14
	CP	15000	36	7,2±1,4*	0,24

CN. controle negativo; LA. lago; CP. controle positivo.

*valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p<0,05$.

Tabela 2. Média e desvio padrão ($\pm$ S.D.) dos valores obtidos para alterações nucleares induzidas em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos a 96 h, às águas oriundas de um ambiente lântico. Coletas: agosto/2006 e fevereiro/2008.

Coletas	Tratamentos	Células com núcleo “blebbed”	Células com núcleo “broken-egg”	Células com núcleo “lobed”	Células com núcleo “notched”	Células em processo de morte celular
Agosto/2006	CN	0,2±0,44	0	1,6±0,8	3,6±0,8	0
	LA	8,6±2,9*	1,6±2,6	6,8±2,04*	12,6±2,07*	0
Fevereiro/2008	CN	0	0	1,4±1,3	3,4±1,5	0
	LA	1,2±2,1	0	3±4	5,2±4,3	6,6±8,8
	CP	13±5,2*	0,2±0,4	11,4±4,1*	11,4±3,7*	0

CN. controle negativo; LA. lago; CP. controle positivo.

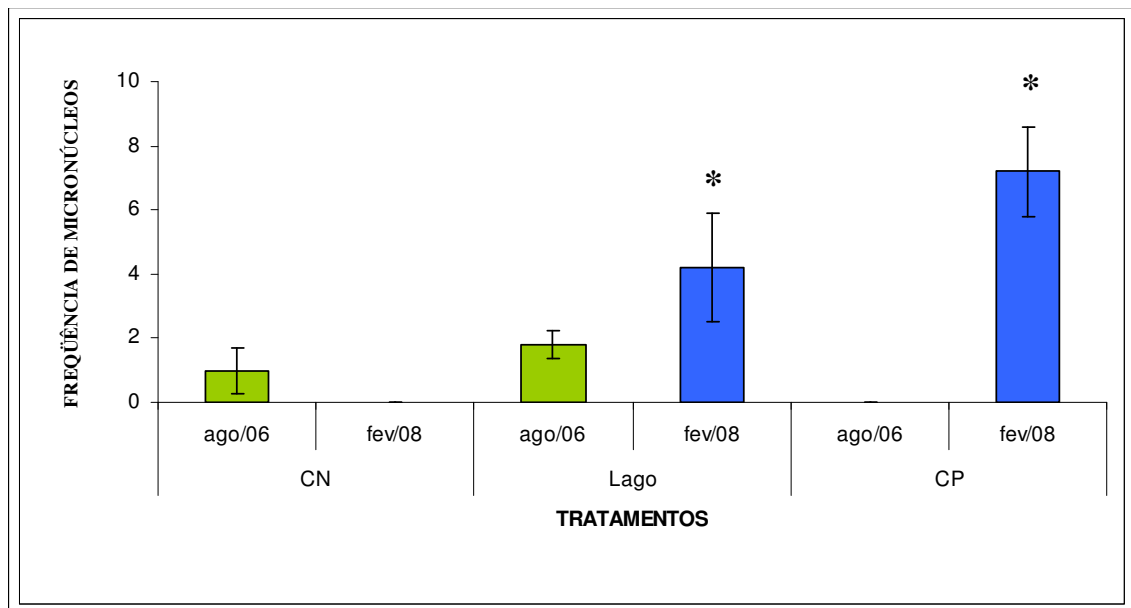
*valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p<0,05$.

Tabela 3. Genotoxicidade das águas de um ambiente lântico, por meio do ensaio do cometa aplicado em eritrócitos *Oreochromis niloticus*. Coleta: Agosto de 2006

Ponto de coleta	Total de nucleóides analisados	Total de nucleóides com cometa	Classe				Escores
			0	1	2	3	
Controle	100	36	64	34	2	0	38
Negativo	100	36	64	33	3	0	39
	100	22	78	17	5	0	27
	100	28	72	24	4	0	32
	100	32	68	30	2	0	34
Total	500	154	346	138	16	0	x = 34
Lago Azul	100	83	17	56	25	2	112
	100	80	20	58	18	4	106
	100	78	12	60	18	10	126
	100	87	13	60	18	9	123
	100	85	15	57	20	8	121
Total	500	413*	77*	291*	99*	33*	x = 117,6*

Nota: os valores seguidos de * diferiram significativamente ($p < 0,05$), pelo método de Krsukall-Wallis. Classificação das classes de migração segundo Rigonato et al. (2005).

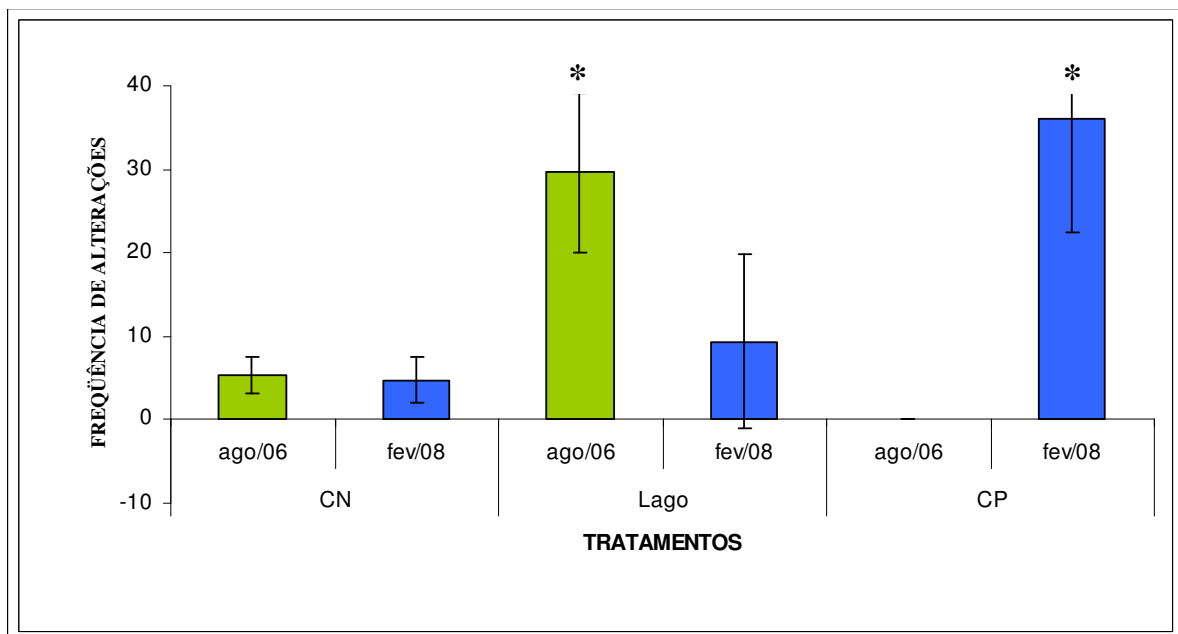
Figura 1



* estatisticamente significativo, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Figura 1 – Distribuição dos valores obtidos para micronúcleos, em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 96 h, às águas de um ambiente lêntico. Coletas: agosto/2006 e fevereiro/2008.

Figura 2



* estatisticamente significativo, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Figura 2 – Somatória das alterações nucleares induzidas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos a 96 h, às águas oriundas de um ambiente lêntico. Coletas: agosto/2006 e fevereiro/2008.

Durante a realização desta dissertação foram produzidos três artigos, dos quais um foi enviado para publicação e os outros estão em fase de envio para revistas especializadas.

ARTIGO 1. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): a methodological comparison.

Cintya Ap. Christofolletti, José Augusto de Oliveira David, Carmem S. Fontanetti

Revista: Genetics and Molecular Biology

ARTIGO 2. A utilização do organismo-teste *Oreochromis niloticus* para o monitoramento ambiental de um ambiente lântico.

Cintya Ap. Christofolletti e Carmem S. Fontanetti

ARTIGO 3. O uso do *Allium test* para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de um ambiente lântico (Lago Azul) - Um estudo de caso.

Cintya Ap. Christofolletti e Carmem S. Fontanetti

**Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): a
methodological comparison**

Cintya Ap. Christofoletti, José Augusto O. David, Carmem S. Fontanetti*

Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Av.
24-A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264135.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Manuscrito submetido à revista Genetics and Molecular Biology

Padrões da Revista

Abstract

In recent years, new methodologies to assess DNA damage have been developed. One of the most widely used technique to detect genotoxicity is the comet assay. The present study applied the comet assay in erythrocytes of specimens of *Oreochromis niloticus* aiming to improve the protocols to detect DNA damage in these cells using two distinct pHs and evaluate whether there is a correspondence between silver and ethidium bromide staining. Animals were exposed to water from an artesian well, and injected with saline solution (72 h) in the non-treated group; and with cyclophosphamide (72 h), in the treated group. Blood was collected, subjected to the alkaline comet assay under specific conditions for unwinding and electrophoresis, using different alkalinities (pH 12.1 and pH>13), for 15 minutes at 21V and 270mA, stained with silver and ethidium bromide. Comets were visually examined, the frequency of cells with and without damage was obtained as well as the distribution of classes and scores. Using the Kruskal-Wallis test, our results revealed that pH 12.1 is more effective, although both pHs can be used. Our findings also suggest that silver staining can substitute ethidium bromide, an expensive and highly toxic stain that requires specific equipment to be examined.

Keywords: pH 12.1, comet assay, ethidium bromide, silver staining, tilapia.

Resumo

Nos últimos anos, novas metodologias para avaliação de danos no DNA têm sido desenvolvidas. Uma das técnicas mais utilizadas para a detecção de genotoxicidade tem sido o ensaio do cometa. Logo, o presente trabalho teve por objetivo aplicar o ensaio do cometa em eritrócitos de indivíduos de *Oreochromis niloticus*, a fim de estabelecer condições adequadas para a análise de danos ao DNA destas células, em dois pHs distintos e avaliar se há correspondência entre as colorações feitas por prata e brometo de etídio. Os animais foram expostos às águas oriundas de um poço artesiano, com injeções intra-peritoneais de soro fisiológico (72 h), tido como grupo não tratado e à ciclofosfamida (72 h), grupo tratado. O sangue foi coletado, submetido ao ensaio do cometa em versão alcalina, sob condições específicas para desenrolamento (relaxamento) e eletroforese, em diferentes alcalinidades (pH 12,1 e pH>13), por 15 minutos à 21V e 270mA, corados por prata e brometo de etídio. Os cometas foram analisados por meio de metodologia visual, considerando a frequência de células com ou sem dano, a distribuição de classes e o escore. Pela análise estatística de Kruskal-Wallis, os resultados obtidos mostraram que o pH 12,1 é mais eficiente, embora ambos os pHs possam ser utilizados. Os resultados sugerem também que a coloração pela prata pode substituir a realizada por brometo de etídio, substância cara, altamente tóxica e que requer equipamentos específicos para sua análise.

Palavras-chave: pH 12.1, ensaio do cometa, brometo de etídio, coloração por prata, tilápia.

1. Introduction

The development of new methodologies and the application of more sensitive assays to detect genotoxicity in different samples have been the subject of several scientific studies of environmental monitoring (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Lemos *et al.*, 2005).

The Comet Assay, or single cell gel electrophoresis, is a sensitive genotoxicological method for assessing DNA damage in single cells, allowing the quantification of DNA breaks and alkaline labile sites. Compared with other genotoxicity tests, the advantages of the comet assay are the detection of little DNA damage, low number of cells required, flexibility, low cost, precision, ease of application, reproducibility, and short period of time to conduct the experiment (Belpaeme *et al.*, 1998; Tice *et al.*, 2000; Bückner *et al.*, 2006).

This technique is the result of the studies of Östling and Johanson (1984), which developed the methodology of DNA electrophoresis in micro-gel, and the study of Singh *et al.* (1988) that improved the technique, obtaining more sensitivity with alkaline solutions. Currently, several international research groups have published recommendations describing protocols and criteria for the comet assay, aiming at establishing high standards to obtain valid, reproducible, and accurate data (Klaude *et al.*, 1996; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Di-Paolo, 2006).

The comet assay has been applied successfully in erythrocytes of several fish species, showing the sensitivity of the blood cells of these animals to genotoxic effects (Padrangi *et al.*, 1995; Belpaeme *et al.*, 1998; Gontijo *et al.*, 2003).

Thus, the present study aimed at applying the comet assay in erythrocytes of specimens of the fish *Oreochromis niloticus*, in order to improve the protocols for analyzing DNA damage in these cells using two distinct pHs and evaluate whether there is a correspondence between silver and ethidium bromide staining.

2. Material and methods

2.1. Biological material

For the bioassay, two 20L aquaria were filled with water from an artesian well aerated for 48 hours and maintained at a room temperature ranging from 20 to 23°C prior to the experiment. Five specimens of *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae), commonly known as Nile tilapia, were placed in aquaria (table 1). Fishes were obtained from a fish tank of the Institute of Biosciences of the São Paulo State University, Rio Claro campus. Fishes were not fed during the experiment and were exposed to a 14:10 h light/dark cycle, under constant aeration. Fishes were divided into two groups, treated and non-treated. Non-treated fishes were injected intraperitoneally with saline solution (30mL de physiological solution/50g of fish) for 72 hours. The treated group received injections of cyclophosphamide (20mg/mL), with applications of 30mL of cyclophosphamide /50g of fish, also for 72h.

2.2. Comet Assay

The comet assay was conducted according to Singh *et al.* (1988) and Villela *et al.* (2006), with some modifications, as follows: slides were previously covered with 1.5% normal melting point agarose. Cardiac punctures were performed and 0.3 mL of blood was drawn from specimens. The assay was conducted in triplicate and later evaluated regarding the effect of different pHs and staining. After cardiac punctures, 5 µL of the blood sample were diluted in 1000 µL of PBS. On previously prepared slides, 10 µL of suspension of cells with 120 µL of 0.5% low melting point agarose at 37°C were layered, coverslipped and placed in the refrigerator for 5 minutes, for solidification of gel. Coverslips were removed and slides were immersed in a freshly-prepared lysis solution (1 mL of triton-X 100, 20 mL of DMSO and 79 mL of lysis stock solution: 2.5 M NaCL, 100 mM EDTA and 10mM Tris,

pH 10.0-10.5) for at least one hour and maximum of two hours at 4°C. After lysis, slides were transferred to a horizontal electrophoresis tank. For the first two runs, alkaline solution was added (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH=12.1) for 20 minutes. Upon the completion of the relaxing time, slides were subjected to electrophoresis for 15 minutes at 21V and 270mA (0.8V.cm⁻¹). The same procedures were followed for the last run, but alkaline buffer (NaOH 300mH and 1mM EDTA, pH>13) was used. All procedures were carried out under indirect light.

After electrophoresis, slides were carefully removed from the tank. Neutralization was performed with three baths of 5 minutes with neutral buffer (0.4M Tris-HCl, pH 7.5) to remove salts and detergents. Slides were then allowed to dry at room temperature.

2.2.1. Ethidium bromide staining

For ethidium bromide staining (Figure 1A-C), slides were fixed with 100% ethanol for 10 minutes and allowed to dry at room temperature. Slides were stained with aqueous solution of ethidium bromide (0.02mg/mL) before examination under fluorescence microscope (Leica DMLB), filter B-3⁴ (excitation: $\lambda = 420$ nM; barrier: $\lambda = 520$ nM), magnification 1000x.

2.2.2. Silver staining

For silver staining (Figure 1D-F), slides were immersed in a fixative solution (15% trichloroacetic acid, 5% zinc sulfate, 5% glycerol), for 10 minutes in a vertical tank, rinsed three times with distilled water and allowed to dry at room temperature overnight. Slides were then rehydrated for 5 minutes with distilled water and stained with 36 mL of solution A (5% sodium carbonate) and 54 mL of solution B (0.1% ammonium nitrate, 0.1% silver nitrate, 0.1% silicotungstic acid, 0.15% formaldehyde, freshly prepared and in the dark) under constant shaker at 37°C for 10 minutes or until slides became gray or brown.

After staining, slides were washed twice with distilled water and immersed in stop solution (1% acetic acid) for 5 minutes and washed again three times with distilled water and allowed to dry at room temperature. Slides were later examined under light microscope at 400x magnification.

2.3. Slides examination and statistics

One hundred comets per slide were examined using a visual classification based on the migration of DNA fragments of the nucleus, according to Rigonato *et al.* (2005). Comets were classified into four classes: class 0 (no damage), class 1 (little damage), class 2 (medium damage), and class 3 (extensive damage). Data were presented as frequency of damaged cells, class distribution, and damage scores, calculated as the sum of cells in each class and the total number of cells in each class multiplied by the class number (0-3). Scores ranged from zero (all cells with no damage - 0×100) to 300 (all cells with maximum damage 3×100), according to Rigonato *et al.* (2005). Statistical analysis was conducted using the Kruskal-Wallis test, with the level of significance set at $p < 0.05$.

3. Results

The results obtained with the comet assay with erythrocytes of *Oreochromis niloticus* is presented as follows: comparison between the two pHs and the two staining methods used in the treatments (figure 1).

The findings revealed that regarding staining at pH 12.1, significant differences were found only in the non-treated group, considering the average of cells with comet as well as damage scores (table 2). A significant increase was observed for the averages of class 1 comets stained with ethidium bromide (figure 2).

Comparing the results for silver staining at pH 12.1 and pH>13, significant differences were also observed in the averages of cells with comet and averages of damage scores (table 2) of the non-treated group. At pH 13, a significant decrease in class 0 comets was observed as well as a significant increase in the averages of comets of classes 1, 2, and 3. The largest increase occurred in the number of class 1 comets (figure 3).

For the results for the treated groups using the two pHs and two stains, no significant differences were observed (figure 4).

Comparing the results obtained for the two treatments, significant differences were found for both pHs, considering the averages of cells with comets and the averages of damage scores, for silver staining as well as ethidium bromide (table 2).

4. Discussion

4.1. The use of erythrocytes of *Oreochromis niloticus* for the comet assay

According to Padrangi *et al.* (1995) and Lemos *et al.* (2005), different tissues of aquatic organisms can be used for the comet assay. However, in most cases, erythrocytes have been used as target-cells, as they require small volumes that can be obtained through a non-damaging technique and cell dissociation is not needed (Belpaeme *et al.*, 1998).

Gontijo *et al.* (2003) also applied the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* to assess a possible modulation of induced DNA damage by benzocaine, in erythrocytes exposed to two known mutagens, (methyl methanesulfonate and hydrogen peroxide). Their findings suggested that benzocaine does not interfere with comet assay results and can be recommended for the welfare of the animal, thus preventing stress.

Souza and Fontanetti (2007) used erythrocytes of *O. niloticus* for the comet assay to detect possible genotoxicants in the waters of the Paraíba do Sul River in an area affected by an oil refinery. The authors concluded that substances with genotoxic potential were present in the waters of the river, as a frequency increase in class 2 and 3 nucleoids was observed in all months of collection.

According to Belpaeme *et al.* (1998), the comet assay can also be used to complement studies of chromosome aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges. Our findings revealed that blood cells of *O. niloticus* used in the comet assay are good genotoxic indicators, consisting of an efficient, fast, and sensitive method to detect DNA damages in these cells.

4.2. Effect of different pHs on comets – pH 12.1 and pH>13

Since it has been described, the single cell gel electrophoresis has been used by researchers in a wide variety of organisms and tissues, improving its usefulness. Thus, to better understand the effects of different pHs on the erythrocytes of tilapias, some changes were made, based on studies of Tice *et al.* (2000), Gontijo *et al.* (2003) and David (2007), using pH 12.1, unwinding time equivalent to 20 minutes and electrophoresis time of 15 minutes, current of 21V and 270mA.

The pH variation during the lysis and electrophoresis steps affect the type of DNA breaks that can occur, as the DNA denatures and unwinds at pHs around 12, due to breaks in hydrogen bridges between DNA strands (Kohn, 1991).

At pH 12.3, breaks in the double and single strands are detected, as well as alkali labile sites or abasic sites (Lee and Steinert, 2003). According to Tice *et al.* (2000), pH>13 is widely used to maximize the expression alkali labile sites and single stranded DNA and thus it is the most recommended, especially for vertebrate cells. However, it is worth pointing out

that there is a wide variety of DNA lesions. Among them, single stranded DNA breaks, which do not have drastic effects, as they are quickly repaired; while double stranded DNA breaks are much more severe and have much more complex repair pathways (Gontijo *et al.*, 2003; Moller, 2006; David, 2007).

Studies conducted by David (2007) using the comet assay in cells of the bivalve *Mytella falcata* at pH>13 revealed high levels of damage. The author then used pH 12.1 (slightly alkaline) to conduct the assay, as the most significant genotoxic damages can be observed at a neutral pH, due to characteristics of marine bivalve DNA.

Di Paolo (2006) evaluated different exposure times of erythrocytes of snooks during different lysis and electrophoresis steps and observed that there was a gradual increase in the intensity of DNA migration according to the increase in voltage of the electrophoresis on the morphology of comets. The author also concluded that the best results were obtained at pH 12.6 and pH>13, with the following conditions: 10 minutes for unwinding; 20 minutes for electrophoresis at 0.8 V/cm and 300 mA, indicating the applicability of blood cells of snooks.

Our results revealed that pH 12.1 as well as pH>13 are effective for the comet assay in tilapia erythrocytes. Although many authors, such as Tice *et al.* (2000) and Gontijo *et al.* (2003) suggested a pH >13 for vertebrate cells and *O. niloticus*, respectively, pH 12.1 was the most efficient in this study, as the scores obtained for cells of the non-treated group using pH>13 was relatively high (~46% of damage), which is not ideal for the comet assay.

On the other hand, the conditions of lysis and electrophoresis may have influenced our results, as the time used for electrophoresis (15 minutes), the voltage (21V) and amperage (270 mA) are different than those suggested by Gontijo *et al.* (2003): 10 minutes for electrophoresis, 25 V and 300 mA.

4.3. Comparisons between silver and ethidium bromide staining

Ethidium bromide is traditionally used for staining of materials examined by fluorescence. This dye, however, has some negative aspects, such as its toxic and mutagenic effects, the need of specific equipments, and short duration of staining. Silver staining, on the other hand, has been described as a good alternative for the comet assay, demonstrating high sensitivity when compared to ethidium bromide staining (Reinhardt-Poulin *et al.*, 2000; Di Paolo, 2006).

Di Paolo (2006) applied the silver staining for the comet assay on blood cells of snooks and found a high sensitivity when visually examining comets, as this is a fast and simple method that can be observed under light microscope. Vilella *et al.* (2006) obtained similar results in the study conducted with the bivalve *Limnoperna fortunei* using different concentrations of copper sulfate and pentachlorophenol.

Garcia *et al.* (2007) described a protocol for silver staining using the comet assay in human lymphocytes exposed to gamma radiation and obtained a significant percentage of DNA in the tail of silver stained comets, very similar to those obtained by fluorescence staining. Other parameters of comets, such as length and momentum of the tail, were also quantified using conventional microcopy and an Internet software.

The results obtained in our study showed that both stains were efficient. Silver staining, however is recommended, as it is less toxic than ethidium bromide, does not require specific equipment for analysis, and provides long lasting staining.

5. Conclusion

This study suggests that erythrocytes of *Oreochromis niloticus* are good genotoxicity indicators through the comet assay, an efficient, fast, and sensitive method to detect DNA damage. Our data also revealed that pH 12.1 is best, although both pHs, 12,1 and pH>13 can

be used with adaptations in the electrophoresis conditions. Also, silver staining is recommended over ethidium bromide.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Dr. Dejanira Franceschi de Angelis of the Laboratory of Water Toxicity of the Department of Biochemistry and Microbiology of the Institute of Biology of UNESP-Rio Claro/SP for technical support, to the FUNDUNESP (Foundation for the Development of the UNESP) and to the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for financial support.

Literature cited

Al-Sabti K and Metcalfe CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 323: 121-135.

Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M (1998) Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 415: 167-184.

Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G (2005) The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20: 245-254.

Bücker A, Carvalho W, Alves-Gomes JA (2006) Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica* 36: 357-364.

David JAO (2007) Estudo de *Mytella falcata* (Mollusca: Bivalvia) como indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de Santos-SP. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro-SP, 199 pp.

Di-Paolo C (2006) Aplicação do Ensaio Cometa a estudos de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona. Dissertação (Mestrado em Ciências – Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 91 pp. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21131/tde-17102006-154149/> (10 de outubro de 2007).

Garcia O, Romero I, González JE, Mandina T (2007) Measurements of DNA on silver satined comets using free Internet software. *Mutat Res* 627: 186-190.

Gontijo AMMC, Barreto RE, Speit G, Reyes VAV, Volpato GL, Salvadori DMF (2003) Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat Res* 534: 165-172.

Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G (1996) The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363: 89-96.

Kohn KW (1991) Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmacol Ther* 49: 55-77.

Lee RF and Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 544: 43-64.

Lemos NG, Dias AL, Silva-Souza AT, Mantovani MS (2005) Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. Environ Toxicol and Pharmacol 19: 197-201.

Moller P (2006) The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. Pharmacol and Toxicol 98: 336-345.

Östling O and Johanson K (1984) Microelectrophoretic study radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 123: 291-298.

Padrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M (1995) Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. Environ Mol Mutagen 26: 345-356.

Reinhardt-Poulin P, McLean JR, Deslauriers Y, Gorman W, Cabat S, Rouabhia M (2000) The use of silver-stained “comets” to visualize DNA damage and repair in normal and *Xeroderma pigmentosum* fibroblasts after exposure to simulated solar radiation. Photochem Photobiol 71: 422-425.

Rigonato J, Mantovani MS, Jordão BQ (2005) Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. Genet Mol Biol 28: 464-468.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175: 184-191, 1988.

Souza TS and Fontanetti CS (2007) Comet assay for water quality assessment of the Paraíba do Sul river, an area under the influence of an oil refinery. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO, 2007, Campinas, p. 1-10, http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0018-1.pdf (In Portuguese)

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ and Mol Mutagen 35: 206-221.

Villela IV, Oliveira IM, Silva J, Henriques JAP (2006) DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. Mutat Res 605: 78-86.

Table 1 – Mean and standard deviation of the weight and size of fishes used in the comet assay for both treatments.

Treatments	Weight (g)	Size (cm)
Non-treated	37.1±10.60	13.24±1.66
Treated	41.34±8.01	13.98±0.82

Table 2 – Average number of cells with comet and damage scores (mean and standard deviation) for the two treatments using two pHs and stainings.

Treatments	pHs	Staining	NA	Comets	Classes				Score
					0	1	2	3	
Non-treated	12,1	silver	500	10.6±1.4 ^{*a,b}	89.2±1.4 ^{*c}	9,4±0.8 ^{*d}	1.2±0.4	0	11.8±1.48 ^{*a,b}
		ethidium bromide	500	18.8±1.92 ^{*a}	81.4±1.6	18.6±1.6	0.2±0.4	0	19±2.2 ^{*a}
		>13 silver	500	46.25±11.20 ^{*b}	54.2±10.2 ^{*c}	39±10.09 ^{*d}	4.75±1.25	2.5±1.2	56±13.31 ^{*b}
Treated	12,1	silver	500	81.2±6.45	18.8±6.4	79±5.8	2.2±1.7	0	83.4±7.4
		ethidium bromide	500	87±3.53	15±1.5	86.2±3.2	0.8±0.8	0	87.8±3.9
		>13 silver	500	87.8±6.97	12.2±6.9	67±13.5	14.6±9.9	6.2±2.2	108.8±9.20

* identical letters: significant difference using the Kruskal-Wallis test (p<0,05).

NA: total nucleoid analyzed.

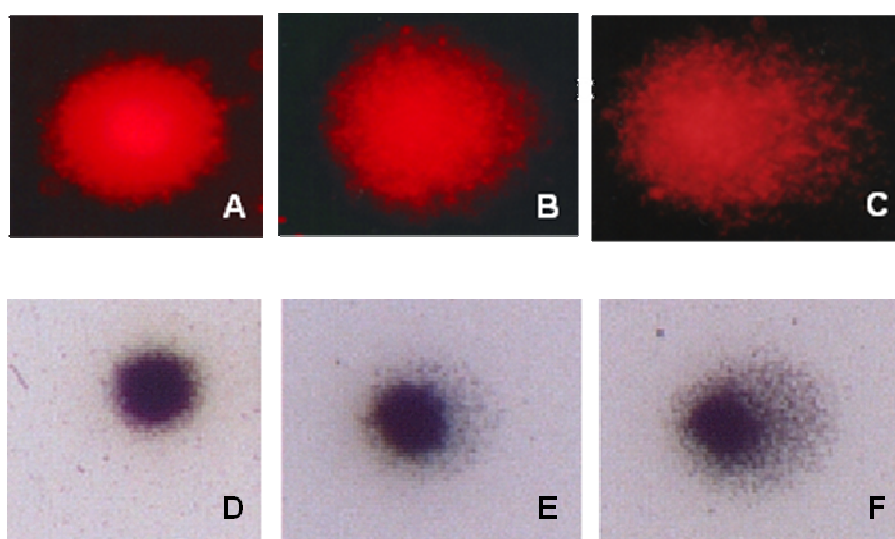


Figura 1. Comet assay applied in erythrocytes of *O. niloticus* using pH 12,1 stained with ethidium bromide (**A.** Class 0, **B.** Class 1, **C.** Class 2) and silver (**D.** Class 0, **E.** Class 1, **F.** Class 2).

Figure 2. Frequency of classes observed using two stains, in the non-treated group at pH 12.1.

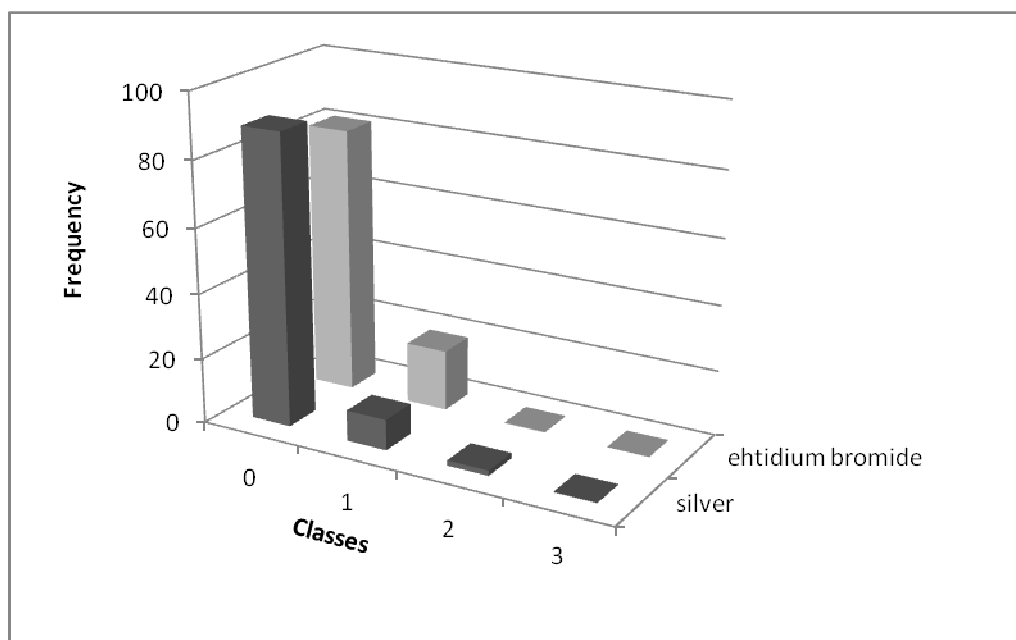


Figure 3. Frequency of classes observed comparing the two pHs, in the non-treated silver stained group.

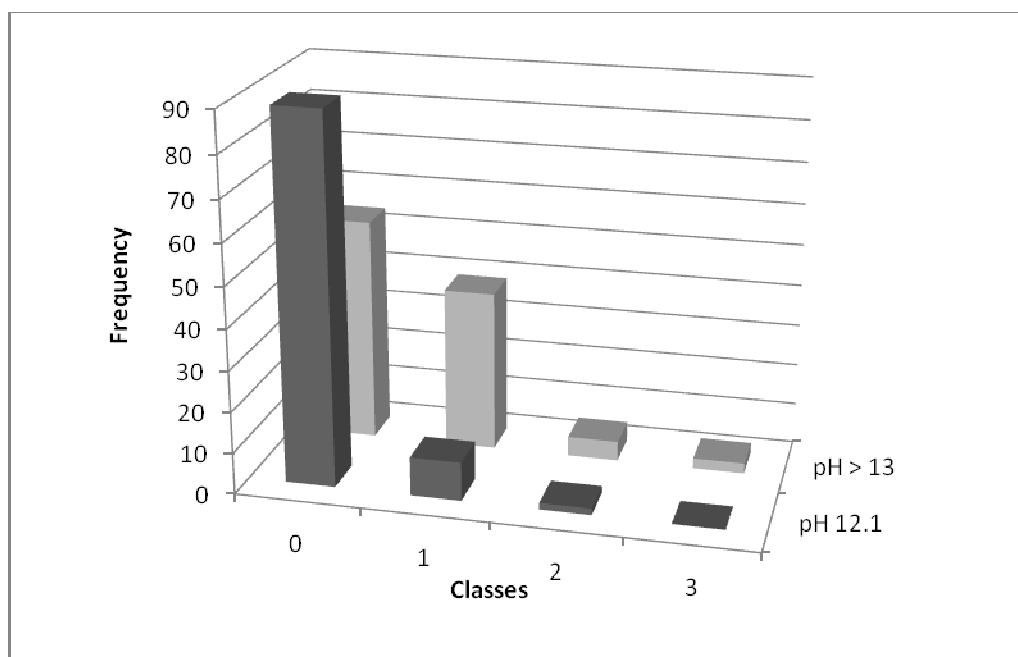
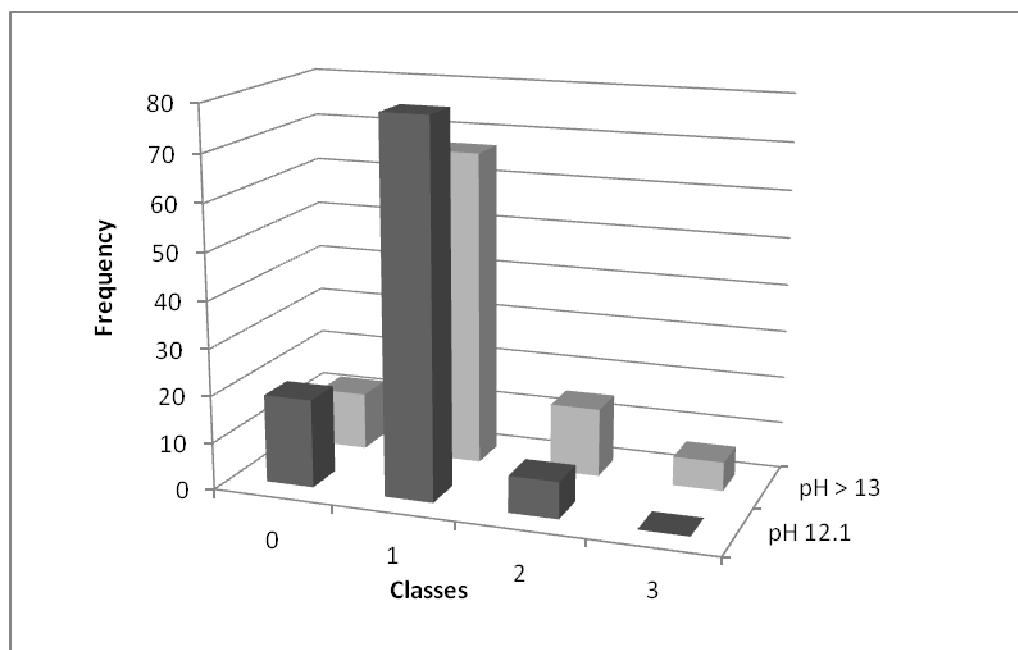


Figure 4. Frequency of classes observed comparing the two pHs, in the treated silver stained group.



A utilização de *Oreochromis niloticus* como organismo-teste para o biomonitoramento de um ambiente lântico.

Cintya Ap. Christofolletti e Carmem S. Fontanetti*

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Av. 24-A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autora para correspondência: Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264135.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

O teste do micronúcleo e o ensaio do cometa foram aplicados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, para avaliação da qualidade da água de um ambiente lântico. Foi tomado como exemplo um lago urbano artificial, o Lago Azul, localizado no município de Rio Claro-SP. As amostras de água foram coletadas nos meses de março e agosto de 2007, na estação chuvosa e de seca, respectivamente, para avaliação da influência da sazonalidade. Foi possível detectar a presença de substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico e substâncias com potencial citotóxico, para essas águas, em ambas as estações. Um pequeno número de células em processo de morte celular foi observado para os dois meses de estudo. Embora uma maior incidência de micronúcleos, estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, tenha sido observada na estação seca, o potencial mutagênico foi evidenciado para as duas estações de coleta. Na estação chuvosa, observou-se uma maior frequência de células com núcleos do tipo “notched”, estatisticamente significativa, bem como um maior potencial genotóxico, evidenciado por cometas de classe 2. As análises físico-químicas dessas águas, para a coleta de agosto/2007, detectaram a presença dos metais Ag, Al³⁺, Cd²⁺, Cu, Fe³⁺ e Hg, com concentrações acima das permitidas pela legislação. Acredita-se que a sazonalidade tenha influenciado nos resultados, por meio dos fenômenos de enriquecimento e/ou diluição dos poluentes, pelas águas pluviais, na estação chuvosa. Os dados apresentados no presente trabalho confirmam a sensibilidade da espécie *O. niloticus*, na detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das águas de um ambiente lântico, por meio do teste do micronúcleo e do ensaio do cometa, aplicado em eritrócitos. Logo, *O. niloticus* é um eficiente organismo-teste para estudos de biomonitoramento ambiental.

Palavras-chave: Teste do micronúcleo, ensaio do cometa, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

1. Introdução

A detecção de compostos potencialmente perigosos nas águas constitui uma árdua tarefa para estudiosos da área, desde que muitas fontes, como despejos industriais, da agricultura e dejetos urbanos podem contribuir para a poluição da água (PELLACANI et al., 2006).

A poluição ambiental aquática é uma das mais sérias e preocupantes, desde que agentes ambientais, com potencial mutagênico, mostraram a capacidade de induzir danos genéticos em vegetais superiores, organismos aquáticos e mamíferos (GRANT, 1994; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Organismos aquáticos, como os peixes, acumulam poluentes diretamente da água e indiretamente pela ingestão de organismos contaminados (SASAKI et al., 1997; ANDRADE et al., 2004). Logo, os poluentes genotóxicos contaminam não apenas os organismos aquáticos, como todo o ecossistema e o próprio homem, através da contaminação de nossos alimentos (CLAXTON et al., 1998; WHITE; RASMUSSEN, 1998; LEMOS et al., 2005).

Para a avaliação da genotoxicidade ambiental, diversos testes vêm sendo utilizados. Dentre eles, o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa têm sido aplicados em peixes, a fim de determinar os efeitos da exposição aos poluentes aquáticos (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001; LEMOS et al., 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006; 2007).

A aplicação do teste do micronúcleo, na maioria das espécies de peixes, tornou-se extremamente vantajosa, quando comparada a outros biomarcadores de mutagenicidade, tais como a troca entre cromátides irmãs e o teste de aberrações cromossômicas, uma vez que os peixes apresentam cromossomos pequenos, em grande quantidade e com baixo índice mitótico (KLIGERMAN, 1982; HAYASHI et al. 1998; AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000).

O ensaio do cometa também se mostra vantajoso quando comparado com outros testes de genotoxicidade, uma vez que consiste na detecção de pequenos danos no DNA. Este ensaio também apresenta vantagens quanto ao número de células para sua realização, ser de fácil aplicação, habilidade de ser conduzido com pequena quantidade da substância-teste e um curto período de tempo para a realização do experimento (TICE et al., 2000).

Neste estudo, a presença de substâncias com potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico nas águas de um ambiente lântico foi avaliada por meio do teste do micronúcleo e

do ensaio do cometa, aplicados em eritrócitos de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), no ano de 2007. Foi tomado como exemplo um lago artificial urbano (Lago Azul, Rio Claro-SP) que recebe esgostos domésticos clandestinos e cargas dos tributários pluviais de diversos bairros da cidade. O estudo de monitoramento das águas deste lago se faz necessário, uma vez que ele é utilizado como área recreacional e de pesca.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização da área de estudo

O Lago Azul (22° 23' 25.79''S / 47° 33' 48.01''W) é um lago artificial, criado pelo represamento do córrego da Servidão, na cidade de Rio Claro, interior do estado de São Paulo. Possui uma área de 3,56 hectares. O represamento do córrego foi construído para contribuir com a drenagem do mesmo, buscando evitar enchentes nesta região da cidade (TANAKA, 2001), uma vez que as águas vindas das ruas dos bairros situados à montante dessa área traziam muitos sedimentos (terra, lixo e entulho), contribuindo para o assoreamento do córrego. Problemas de inundação, infiltração, erosão e contaminação das águas por esgoto ocorrem em diferentes pontos do córrego e também no lago, mesmo depois da canalização.

Atualmente, com 110.000 m² de área verde, o lago é tido como área de recreação e lazer, possui quadras poliesportivas, parques, pistas para caminhadas, além da prática de atividade pesqueira. A pesca foi proibida pela Prefeitura Municipal de Rio Claro, no ano de 2005.

2.2 Coleta das amostras

A água utilizada no presente trabalho foi coletada em março (estação chuvosa) e em agosto (estação seca), do ano de 2007. As amostras de água foram coletadas numa profundidade de 30 cm, sendo levadas imediatamente ao Departamento de Biologia da UNESP – Campus de Rio Claro, onde foram mantidas a 4°C, até o início dos experimentos.

Dados meteorológicos foram mensurados, para todos os dois meses de coleta, junto ao Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA), da UNESP de Rio Claro.

2.3 Determinação da concentração de metais pesados

A análise química das amostras de água foi realizada, concomitantemente, com os ensaios biológicos, na coleta de agosto/2007. As amostras foram levadas ao laboratório em frascos de plástico próprios para coleta, lavados com HNO₃ 1N.

A concentração de metais foi determinada pelo método USEPA-SW 846, pelo laboratório ASL Análises Ambientais, da cidade de Rio Claro.

2.4 Bioensaios com *O. niloticus*

Para os bioensaios foram utilizados três aquários, com capacidade de 20L cada. Dois aquários continham águas oriundas de poço artesiano, para controles positivo e negativo, e um terceiro aquário, águas provenientes do Lago Azul. Os aquários permaneceram em aeração por 48 h, em sala com temperatura de 20 a 23°C, antes do início dos experimentos. Decorrido este tempo, cinco peixes da espécie *O. niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente como tilápia-do-Nilo, foram colocados em cada aquário (tabela 1). Os peixes foram obtidos do tanque de piscicultura do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro. Os animais não foram alimentados durante todo o experimento e ficaram expostos ao fotoperíodo controlado, correspondente às respectivas estações (março: verão; agosto: inverno), sob constante aeração, por 96 h. Para controle positivo, os peixes foram expostos a injeções intra-peritoniais de ciclofosfamida (20mg/mL), com aplicações de 30 mL de ciclofosfamida/50 g de peixe. A fim de submeter os peixes do controle negativo e os peixes expostos às águas do lago, ao mesmo estresse dos peixes do controle positivo, injetou-se intra-peritonalmente 30 mL de soro fisiológico/50 g de peixe.

2.4.1 Teste do Micronúcleo

Por meio de punção cardíaca, com seringas heparinizadas, foi retirado aproximadamente 0,3 mL de sangue, por animal. Logo após a punção, a agulha foi limpa com papel absorvente. A primeira gota foi descartada a fim de evitar a contaminação do sangue por fluídos corpóreos, sendo as gotas posteriores utilizadas para a confecção das lâminas, por meio da técnica de esfregaço sangüíneo (extensões sangüíneas).

Foram realizadas três extensões sangüíneas para cada indivíduo. As lâminas foram fixadas em etanol PA, por 10 minutos e secas à temperatura ambiente. Logo após, foram

submetidas à reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), com uma hidrólise ácida por 11 minutos. Decorrido o tempo da reação, as lâminas foram lavadas por três vezes em água destilada, secas à temperatura ambiente e posteriormente analisadas.

2.4.1.1 Análise das lâminas e estatística

Para cada peixe, foram analisados 3000 eritrócitos, sob objetiva de imersão (aumento de 1000x), para a determinação da frequência de células micronucleadas. Alguns critérios foram adotados para a identificação de micronúcleos, segundo Huber et al. (1983): boa preservação e coloração do citoplasma; micronúcleo e o núcleo principal dentro do mesmo citoplasma; ausência de conexão entre núcleo e micronúcleo; o diâmetro máximo do micronúcleo não deve ultrapassar a metade do núcleo; manutenção da esfericidade do núcleo e micronúcleo. Durante a análise citológica, os eritrócitos podem apresentar ainda algumas alterações como: cariólise, células binucleadas, brotos celulares, broken-eggs e anormalidades da morfologia nuclear (CARRASCO et al., 1990). As anormalidades descritas por Carrasco et al. (1990), tais como núcleos do tipo “blebbed”, “lobed”, “notched”, foram conjuntamente analisadas no teste do micronúcleo.

O teste estatístico utilizado para a comparação dos resultados de cada grupo de tratamento foi o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

2.4.2 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi conduzido segundo Singh et al. (1988) e Vilella et al. (2006), com algumas modificações, descritas a seguir: as lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5%. Após a punção cardíaca, 5 µL do sangue foi diluído em 1000 µL de PBS. Sobre as lâminas pré-gelatinizadas foram gotejadas 10 µL da suspensão celular misturadas a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5%, à 37°C, cobertas com lamínulas e colocadas no refrigerador, por 5 minutos, para solidificação do gel. As lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas à solução de lise recém preparada (1 mL de triton-X 100, 20 mL de DMSO e 79 mL de solução lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0-10,5) por no mínimo uma hora e no máximo duas horas, à 4°C. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese.

Para as corridas, adicionou-se tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, de pH

12,1) por 20 minutos. Decorrido o tempo de relaxamento, submeteu-se as lâminas à eletroforese por 15 minutos à 21V e 270mA ($0,8V.cm^{-1}$). Toda a metodologia acima foi conduzida sob luz indireta.

Ao término da eletroforese, as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba. A neutralização foi feita em três banhos de 5 minutos com tampão neutro (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5), para a remoção de sais e detergentes, secas à temperatura ambiente.

2.4.2.2 Coloração por prata

Para a coloração por prata, logo após a neutralização, as lâminas foram cobertas por uma solução de fixação (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco 5%, glicerol 5%), por 10 minutos, em uma cubeta vertical, lavadas por três vezes em água destilada e colocadas para secar em temperatura ambiente, até o dia seguinte. Logo após, foram rehidratadas por 5 minutos em água destilada e em seguida, coradas por 36 mL de solução A (carbonato de sódio 5%) e 54 mL de solução B (nitrato de amônia 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido silicotungstico 0,25%, formaldeído 0,15%, recém preparado e no escuro) sob constante agitação a 37°C, por 10 minutos ou até as lâminas atingirem coloração entre o cinza e/ou marron. Após a coloração, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e submetidas à solução stop (ácido acético 1%), por 5 minutos e lavadas novamente, por três vezes, em água destilada e deixadas a secar em temperatura ambiente, posteriormente sendo analisadas em microscópio de luz, em objetiva de 40x.

2.4.2.3 Análise das lâminas e estatística

Para a análise dos resultados foram observados 100 cometas por lâmina, utilizando a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA do núcleo, segundo Rignonato et al. (2005). Os cometas obtidos foram classificados em quatro classes: classe 0 (sem dano aparente), classe 1 (pouco dano – nucleóides apresentando um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça), classe 2 (dano médio – nucleóides apresentando um tamanho de cauda equivalente a uma ou duas vezes o tamanho do diâmetro da cabeça) e classe 3 (dano intenso – nucleóides apresentando o tamanho da cauda superior a duas vezes o diâmetro da cabeça). Os dados foram apresentados como frequência de células com dano, a distribuição de classes e o escore de dano, calculado como a soma do número de células em cada classe e o

total da classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3); logo, os escores podem variar de zero (todas as células sem dano - 0x100) a 300 (todas as células com dano máximo 3x100). A análise estatística foi realizada utilizando o método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Análise dos dados climatológicos e das análises físico-químicas

Os dados climatológicos obtidos demonstraram grande variação nas médias mensais de temperatura (mínima e máxima), número total de dias chuvosos e a precipitação total, caracterizando bem a estação chuvosa e seca, na cidade de Rio Claro-SP (tabela 2).

A análise química das águas do Lago Azul, para agosto/2007, mostrou elevadas concentrações de Ag, Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu, Fe^{3+} e Hg (tabela 3). Tais valores se encontram acima dos limites estabelecidos pela portaria 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

3.2 Análise dos dados obtidos no teste do micronúcleo e no ensaio do cometa

Houve uma mortandade de peixes expostos às águas “brutas” do lago, na coleta de agosto/2007, o que acabou inviabilizando o estudo pela limitação do número de células a serem analisadas. Optou-se por diluir a água na proporção de 2:1 (2 partes de águas do lago: 1 parte de água de poço artesiano). Mesmo após essa diluição, um peixe morreu e tentou-se então, uma nova diluição 1:2 (1 parte de água do lago: 2 partes de águas de poço artesiano), a qual possibilitou a realização do experimento com o n adequado. De acordo com os resultados obtidos, a diluição 2:1, na estação seca, mesmo com um n a menos, apresentou valores estatisticamente significativos para a avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do lago.

Os resultados obtidos pela análise de eritrócitos micronucleados (Figuras 1A e 1B) em *Oreochromis niloticus*, expostos às águas do lago, na estação chuvosa e seca, apresentaram valores estatisticamente significativos (tabela 4, figura 2).

Eritrócitos com alterações na morfologia nuclear, como “broken-egg” (Figura 1C), “lobed” (Figuras 1D e 1E), “notched” (Figura 1F), “blebbed” (Figura 1G) e células em processo de morte celular (Figuras 1H e 1I) também foram observados para as duas estações.

Embora todas essas alterações tenham sido observadas, somente eritrócitos portadores de núcleo do tipo “notched” diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do controle negativo, nas duas coletas realizadas. As frequências de cada alteração observada, para as duas estações, encontram-se na tabela 5, figura 3.

A análise dos resultados do ensaio do cometa, igualmente aplicado em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos às águas do Lago Azul, nas mesmas coletas, revelaram o potencial genotóxico dessas águas, para as duas estações.

No presente estudo, a frequência de nucleóides em cada classe de migração e o escore do dano foram utilizados como parâmetros para a avaliação da genotoxicidade (Figura 4). Para esta avaliação foram observadas as classes 0, 1 e 2 de migração dos cometas (Figura 5).

Examinando a distribuição dos cometas em cada classe (tabela 6), verificou-se que na estação chuvosa, a frequência de nucleóides pertencentes à classe 2 foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle negativo. Já na estação seca, a frequência de nucleóides mais observada foi a pertencente à classe 1.

4. Discussão

Águas superficiais, tais como as de rios e lagos, recebem grandes quantidades de efluentes, sejam eles derivados da agricultura, da indústria e/ou de origem doméstica. Essas águas, que muitas vezes contém compostos desconhecidos, com potencial genotóxico e/ou mutagênico, são utilizadas como fontes de água potável para o consumo humano, na irrigação e atividades recreacionais. Conseqüentemente, a poluição da água pode ser um sério problema para a saúde pública, devido aos efeitos adversos que pode provocar e também para o ambiente aquático, com a deterioração do ecossistema e da diversidade da biota local (MORAES; JORDÃO, 2002; PELLACANI et al., 2006).

Estudos têm reportado a ocorrência de malignidades e outras patologias em organismos aquáticos, expostos a compostos genotóxicos (DEPLEDGE, 1994). Logo, inúmeros testes têm sido desenvolvidos com organismos aquáticos para a avaliação da genotoxicidade/mutagenicidade ambiental.

Peixes são considerados bons indicadores para a detecção de contaminantes dos recursos hídricos por substâncias genotóxicas (BÜCKER et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006), neste contexto, a espécie *O. niloticus* tem sido largamente utilizado na genética toxicológica (GRISOLIA; STARLING, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; VENTURA et al., 2008). De acordo com Alves-Costa (2001), a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) constitui

excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais, sendo freqüentemente utilizada para a investigação da toxicidade de substâncias contaminantes de ecossistemas aquáticos. Segundo Vijayan et al. (1996), *O. niloticus* é reconhecida pela sua sensibilidade em responder, rapidamente, às alterações ambientais.

O teste do micronúcleo e o ensaio do cometa foram aplicados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos às águas oriundas de um lago urbano, como ferramentas para o monitoramento das águas deste lago. Para o teste do micronúcleo, nossos resultados mostraram uma alta freqüência de micronúcleos em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos às águas do lago, nas duas estações de coletas. Tais dados sugerem que essas águas apresentam potencial mutagênico e são concordantes com pesquisas que utilizaram o teste do micronúcleo e de anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes, os quais também demonstram uma alta incidência dessas alterações, em peixes expostos a amostras ambientais. (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; GRISOLIA; STARLING, 2001; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

De acordo com Al-Sabti; Metcalfe (1995) os micronúcleos podem estar relacionados a um atraso cromossômico na anáfase, caracterizado por um mau funcionamento do fuso ou, segundo Frieauff et al. (1998).devido à presença de fragmentos cromossômicos, resultantes de quebras cromossômicas.

Nos últimos anos, além dos micronúcleos, outras anormalidades nucleares têm recebido uma atenção especial (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; SOUZA; FONTANETTI, 2006). A anormalidade estatisticamente significativa, em relação ao controle negativo, neste estudo, foram núcleos do tipo “notched”, em ambas as estações de coleta, embora uma freqüência maior tenha sido observada na estação chuvosa. De acordo com Ghandially (1982), alterações nucleares do tipo “notched” e “vacúolos” provavelmente estão associados à aneuploidia.

As águas do lago também apresentaram a potencialidade de induzir morte celular, mesmo em número reduzido, nas duas amostras, indicando que a qualidade dessas águas se encontra comprometida e que as mesmas devem caracterizar condições estressantes para os organismos expostos, apresentando, portanto, potencial citotóxico.

Exposições a agentes genotóxicos, presentes no meio aquático, podem levar a perda da integridade do DNA, como demonstrado neste estudo, pelo elevado índice de quebras, resultando em cometas de classes 1 e 2, encontradas no material genético dos eritrócitos de *O. niloticus*. Um maior potencial genotóxico foi detectado na estação chuvosa, uma vez que um maior número de cometas pertencentes à classe 2 fora encontrado para esta estação.

A partir dessas afirmações podemos concluir que as águas do lago possuem em sua composição substâncias ou compostos químicos de ação aneugênica e/ou clastogênica. Sugerimos que as substâncias atuantes sejam os metais encontrados em concentrações maiores do que as permitidas pela legislação brasileira (CONAMA 357/2005).

Embora a maioria dos estudos com metais e peixes esteja relacionado à bioacumulação desses compostos em tecidos desses organismos, a genotoxicidade de alguns metais encontrados em maior concentração, nas águas do lago, também é descrita.

A prata (Ag) é um metal que ocorre naturalmente na natureza, graças aos processos naturais de erosão. Sua descarga no ambiente se dá pelo seu uso industrial (indústrias fotográficas e de eletrônicos) e pelo despejo de efluentes das estações de tratamento. É ainda um metal não essencial que, quando está presente em elevadas concentrações no ambiente aquático, intoxica os organismos, sendo que a forma iônica deste metal é, geralmente, a mais tóxica (PURCELL; PETERS, 1998; GROSSEL et al., 1999). Na literatura, em peixes e crustáceos, a prata está relacionada a um desequilíbrio iônico e osmorregulatório, associado às inibições da atividade da Na^+/K^+ -ATPase e da captação de Na^+ em nível branquial (GROSSEL et al., 2002).

Elevadas concentrações de alumínio e chumbo também foram detectadas nas águas do Lago Igapó II (Londrina-PR), em estudos realizados por Yabe; Oliveira (1998). De acordo com esses autores, esses agentes podem ser responsáveis pelos danos causados ao DNA dos eritrócitos de *Tilapia rendalli*, observados pelo ensaio do cometa.

A indução de micronúcleos foi reportada previamente por peixes expostos ao cádmio (SANCHEZ-GALAN et al., 1999; AYLLÓN; GARCIA VAZQUEZ, 2000). Foi sugerido que o cádmio exibe o seu potencial genotóxico, principalmente, por induzir quebras na fita simples, geradas por interações diretas de Cd-DNA, bem como pela ação de nucleases de incisão e/ou DNA glicosilases durante o reparo do DNA (PRIVEZENTSEV et al., 1996; ERGENE et al., 2007).

O cobre (Cu) é um elemento essencial aos organismos e a sua necessidade é regulada por mecanismos de controle homeostáticos. A toxicidade do cobre ocorre quando tais mecanismos de controle, dentro de um determinado compartimento, são sobrecarregados e/ou quando os mecanismos de reparo celular são deteriorados (PEDROZO; LIMA, 2001). Quando presente em elevadas concentrações na água, o Cu é capaz de intoxicar os organismos aquáticos, uma vez que o alvo deste metal parece ser a homeostase do sódio, influenciando na absorção de cloretos e na excreção de compostos nitrogenados. Sua forma iônica geralmente é a mais tóxica (GROSSEL et al., 2002).

Estudos realizados por Godet et al (1996) avaliaram a genotoxicidade de efluentes de galvanoplastia, por meio do teste do micronúcleo em larvas de anfíbios (Trituridae). O ferro (Fe) foi um dos elementos em maior concentração neste efluente, tanto na forma solúvel como na insolúvel. Este metal também foi capaz de induzir um elevado índice de micronúcleos nesses organismos.

Os efeitos genotóxicos do mercúrio, metilmercúrio e selênio, bem como a mistura desses elementos, foram avaliados por Al-Sabti (1991), por meio de estudos realizados em eritrócitos de carpas da Prússia (*Carassius auratus gibelio*). O autor observou uma alta frequência de micronúcleos nos eritrócitos dos grupos expostos, quando comparados aos resultados obtidos para o grupo controle.

Todavia, alguns autores (ERGENE et al., 2007) descrevem que as concentrações dos poluentes nas águas, geralmente depende do fenômeno de enriquecimento ou diluição, causado pela chuva ou pela drenagem de águas dos sistemas de irrigação. Por outro lado, a baixa precipitação pode ter seu efeito reduzido pela diluição dos poluentes com as águas da chuva ou ainda, ter seus efeitos agravados, pela maior lixiviação dos poluentes provenientes do solo ou da rede de esgotos.

Segundo Esteves (1998), em ambientes de alagamento temporário ou lagos muito rasos, é possível que ocorra uma maior interação dos elementos presentes no sedimento com a coluna d'água. Ainda de acordo com este autor, essa característica é marcadamente sazonal. Portanto, inferimos que a presença de tais metais nas águas do lago estudado podem ser decorrentes destes fenômenos e que a ação dos mesmos podem ter influenciado nos resultados obtidos nos testes realizados.

5. Conclusão

Nossos dados confirmam a sensibilidade da espécie *Oreochromis niloticus*, na detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das águas de um ambiente lântico, por meio do teste do micronúcleo e do ensaio do cometa, aplicado em eritrócitos desses espécimes. A qualidade das águas do lago analisado se encontra comprometida, uma vez que essas foram capazes de induzir a formação de micronúcleos e provocar danos ao DNA dos organismos expostos. Tais resultados podem ser decorrentes das elevadas concentrações de metais (Ag, Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu, Fe^{3+} e Hg) detectadas nas análises químicas destas águas.

Agradecimentos

Agradecemos a FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro, ao administrador do Lago Azul, Sr. Marcuci, pelo suporte técnico e a Prefeitura de Rio Claro/SP, na pessoa do Sr. Antonio Fernando David Reginato, secretário de Agricultura, Abastecimento e Silvicultura, pela autorização das coletas.

Referências Bibliográficas

AL-SABI, K. Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes. **Ljubljana**: Yugoslavia, 221p, 1991.

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

ALVES-COSTA, J. R. M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 2001. 125f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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**, Amsterdam, v.560, p.57-67, 2004.

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

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

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v.72, p.722-725, 2008.

CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L., MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v.47, p.2123-2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v.538, p.81-91, 2003.

CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; HUGHES, T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, Amsterdam, v.410, p.237-243, 1998.

DEPLEDGE, M.H. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations. **Environmental Health Perspectives**, NC US, v.102, n.12, p. 101-104, 1994.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELİK, A.; KOLELİ, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, New York, v.16, p.385-391, 2007.

ESTEVEZ, F.A. Fundamentos de Limnologia. **Editora Interciência**, Rio de Janeiro, 2ª edição, 1998, 602 p.

FRIEAUFF, W.; POTTER-LOCHER, F.; CORDIER, A.; SUTTER, W. Automatic analysis of the *in vitro* micronucleus test on V79 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v.413, p.57-68, 1998.

GHANDIALLY, F.N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. **Butterworths**, London, 1982, 971 p.

GODET, F.; BABUT, M.; BURNEL, D.; VEBER, A.M.; VASSEUR, P. The genotoxicity of iron and chromium in electroplating effluents. **Mutation Research**, Amsterdam, v.370, n.1, p.19-28, 1996.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, p.175-185, 1994.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.1, p.235-239, 2000.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v.491, p.39-44, 2001.

GROSSEL, M.; DE BOECK, G.; JOHANNSSON, O.; WOOD, C.M. The effects of silver on intestinal ion and acid-base regulation in the marine teleost fish, *Parophrys vetulus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v.142, p.259-270, 1999.

GROSSEL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v.133, p.287-303, 2002.

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**, Amsterdam, v.399, n.2, p.125-133, 1998.

HUBER, R.; STRENT, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosymetry. **Mutation Research**, Amsterdam, v.111, p.185-193, 1983.

KLIGERMAN A. D. Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In: HEDDLE J. A. (ed). **Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology**, Academic Press, p.435-456, 1982.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, Amsterdam, v.650, p.80-86, 2008.

LEMOES, 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**, Amsterdam, v. 19, p.197-201, 2005.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, p.148-158, 2006.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.30, p.665-676, 1978.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. **Série de Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador, v.4, 128 p., 2001.

PELLACANI, C.; BUSCHINI, A.; FURLINI, M.; POLI, P.; ROSSI, C. A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v.77, p.1-10, 2006.

PRIVEZENTSEV, K.V.; SIROTA, N.P.; GAZIEV, A.I. The genotoxic effects of cadmium studied in vivo. **Tsitologia i Genetika**, Ukraine, v.30, p.45-51, 1996.

PURCELL, T.W.; PETERS, J.J. Sources of silver in the environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.17, p.539-546, 1998.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; JORDÃO, B.Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.3, p.464-468, 2005.

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 Environmental Safety**, New York, v.43, p.301-304, 1999.

SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S. MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, Amsterdam, v.393, n.1-2, p.133-139, 1997.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v.605, p.87-93, 2006.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO, Campinas, p. 1-10, 2007.

TANAKA, P. R. **O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro – SP)**. 2001. 40f. (Trabalho de Conclusão de Curso- Ecologia). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Amsterdam, v.35, p.206-221, 2000.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.199, p.2467-2475, 1996.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.605, p.78-86, 2006.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, Amsterdam, v.410, p.223-236, 1998.

YABE, M.I.S.; OLIVEIRA, E.O. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química nova**, São Paulo, v.21, p.551-556, 1998.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos pesos e tamanhos dos peixes (*O. niloticus*) distribuídos entre os aquários, para as coletas de março e agosto/2007.

Coleta	Tratamento	Peso (g)	Tamanho (cm)
Março/2007	Controle Negativo	37,1±10,6	13,4±1,6
	Lago Azul	40,6±11,5	13,3±1,2
	Controle Positivo	44,4±13,1	14±0,8
Agosto/2007	Controle Negativo	21,4±4,1	10,8±0,5
	Lago (2:1)	23,3±6,2	10,2±0,5
	Lago (1:2)	25,02±7,7	11,1±1,5
	Controle Positivo	23,02±6,6	10,3±1,3

Tabela 2. Dados climatológicos da cidade de Rio Claro-SP, referentes aos períodos de coleta das amostras de água oriundas de um ambiente lântico, obtidos junto ao CEAPLA – IGCE – UNESP/ Rio Claro.

Período de coleta	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação Total (mm)	Nº total de dias chuvosos
Março/2007	31,31	18,81	67,60	123,9	10
Agosto/2007	28,04	11,21	58,32	0	0

Nota: Os valores acima foram obtidos a partir das médias das medidas diárias.

Tabela 3. Comparação dos valores obtidos para as análises físico-químicas das águas superficiais do Lago Azul, para a coleta de agosto/2007.

Parâmetros Analíticos	CONAMA	Agosto/2007	Método	Limite de detecção
Ag (mg/L)	0,01	<0,09*	USEPA-SW 846	0,090
Al (mg/L)	0,1	0,695*	USEPA-SW 846	0,050
As (mg/L)	0,01	<0,01	USEPA-SW 846	0,010
Cd (mg/L)	0,001	<0,004*	USEPA-SW 846	0,004
Co (mg/L)	0,05	<0,002	USEPA-SW 846	0,002
Cu (mg/L)	0,009	<0,025*	USEPA-SW 846	0,025
Cr total (mg/L)	0,05	<0,005	USEPA-SW 846	0,005
Fe total (mg/L)	0,3	1,51*	USEPA-SW 846	0,030
Hg (mg/L)	0,0002	<0,0006*	USEPA-SW 846	0,0006
Na (mg/L)	NA	9,8	SMEWW 3500-NA.B	0,1
Ni (mg/L)	0,025	<0,006	USEPA-SW 846	0,006
Pb (mg/L)	0,01	<0,002	USEPA-SW 846	0,002
Zn (mg/L)	0,18	<0,035	USEPA-SW 846	0,004
Cloretos (mg/L)	250	6,67	USEPA 300.1.321	0,05
DBO (mg/L)	5	13*	SMEWW 5210.B	2
DQO (mg/L)	5	45*	SMEWW 5220.D	1,67
pH	6,0 a 9,0	6,8	SMEWW 4500-H+.B	0,1
Sólidos totais dissolvidos (mg/L)	500	120	SMEWW 2540	1
Condutividade elétrica (µS/cm)	NA	500	SMEWW 2510.B	0,1
COT (mg/L)	NA	14,0	SMWW 5310.D Oxidação com persulfato - espectrofotômetro	NA
Nitrito (mg/L)	1	<0,15	USEPA 300.1-321	0,005
Nitrato (mg/L)	10	<0,015	USEPA 300.1-321	0,05
Turbidez (UNT)	100	63,0	SMEWW 2130.B	1

* Valores acima dos permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) – resolução 357/2005.

Nota: NA – não aplicável

Tabela 4. Distribuição dos valores obtidos para micronúcleos, em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 96 h, às águas oriundas de um ambiente lântico. Coletas: março e agosto/2007.

Coletas	Pontos	Total de eritrócitos analisados	Número total de MN observados	Média e desvio padrão	Frequência (%) de MN observados
Março/2007	CN	15000	4	0,8±0,83	0,02
	LA	15000	31	6,2±1,3*	0,2
	CP	15000	34	6,8±1,09*	0,22
Agosto/2007	CN	15000	5	1±0,7	0,03
	LA (2:1)	12000	28	7±0,81*	0,18
	LA (1:2)	15000	11	2,2±1,64*	0,07
	CP	15000	37	7,4±1,14*	0,24

CN. controle negativo; LA. lago; CP. controle positivo.

*valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

Tabela 5. Média e desvio padrão ($\pm$ S.D.) dos valores obtidos para alterações nucleares induzidas em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos a 96 h, às águas oriundas de um ambiente lântico. Coletas: março e agosto/2007.

Coletas	Tratamentos	Células com núcleo “blebed”	Células com núcleo “broken-egg”	Células com núcleo “lobed”	Células com núcleo “notched”	Células em processo de morte celular	Somatória das Alterações
Março/2007	CN	6,6±2,07	0	4,2±1,9	8±1,5	0	18,8±5,5
	LA	9,8±4,2	0	9±2	15,4±2,07*	1±1,2	35,2±9,5*
	CP	15,8±1,6*	0	10,4±3,04*	15,6±4,3*	0	41,8±9,02*
Agosto/2007	CN	0,8±1,3	0	2,8±4,2	2,4±3,7	0	6±9,2
	LA (2:1)	1,2±1,8	0,2±0,5	2±1,6	5,2±0,9*	0,2±0,5	9±5,4
	LA (1:2)	0,4±0,8	0	1,4±1,5	2,8±2,1	0	4,6±4,5
	CP	3±1,5	1,6±1,1	5±1,5	9,2±2,04*	0	18,8±6,3*

CN. controle negativo; LA. lago; CP. controle positivo.

*valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$.

Tabela 6. Danos ao DNA mensurados (média e desvio padrão) durante as duas coletas sazonais (março e agosto/2007) em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos por 96h às águas oriundas de um ambiente lântico. Coletas: março e agosto/2007.

Coletas	Tratamentos	Número de células com cometa	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Escore
Março/2007	CN	7,2±1,6	92,8±1,6	6,6±1,5	0,6±0,5	0	7,8±1,2
	LA	67,2±8,1*	32,8±8,1	66±7,7*	1,2±0,4	0	68,4±8,5*
	CP	87±8,1*	13±8,1*	72,2±8,2*	14,8±6,3*	0	101,8±12,1*
Agosto/2007	CN	19,6±4,9	80,4±4,9	19,6±4,9	0	0	19,6±4,9
	LA (2:1)	83,2±7,1*	16,7±7,1*	83,2±7,1*	0	0	83,2±7,1*
	LA (1:2)	58,8±7,7	41,2±7,7	58,6±7,6	0,2±0,4	0	59±7,9
	CP	91,4±3,2*	8,6±3,2*	87,8±3,9*	3,6±1,6	0	95±3,2*

CN. controle negativo; **LA.** lago; **CP.** controle positivo.

*valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Kruskal Wallis, com $p < 0,05$.

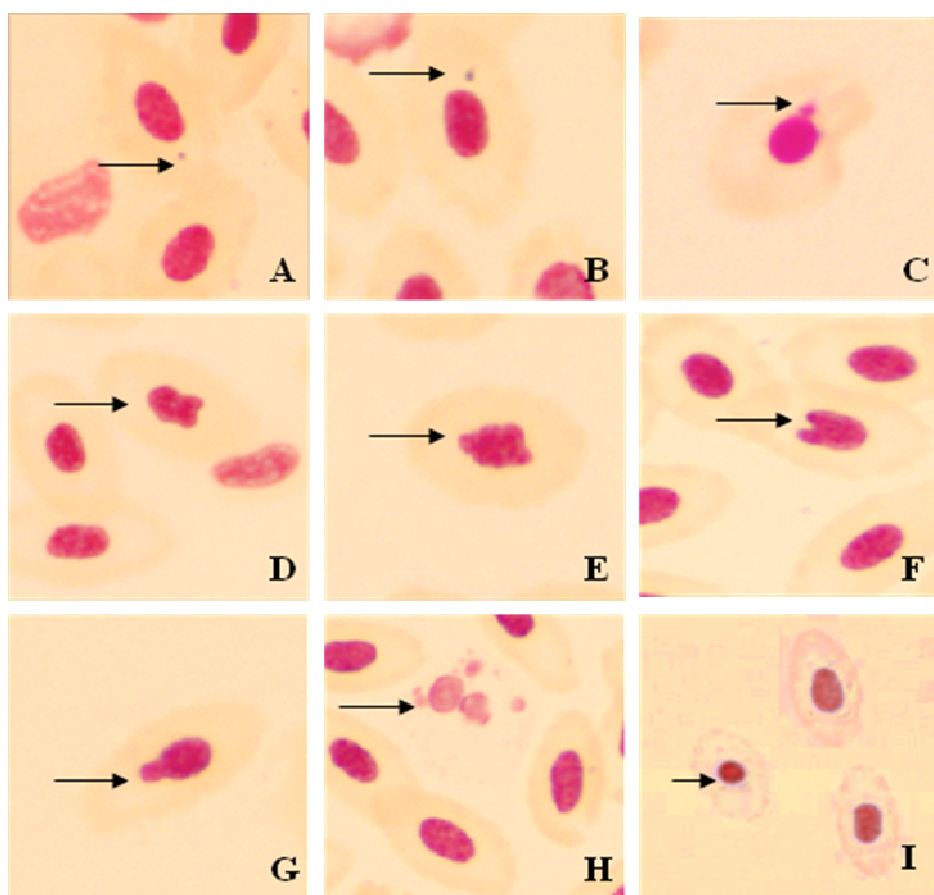
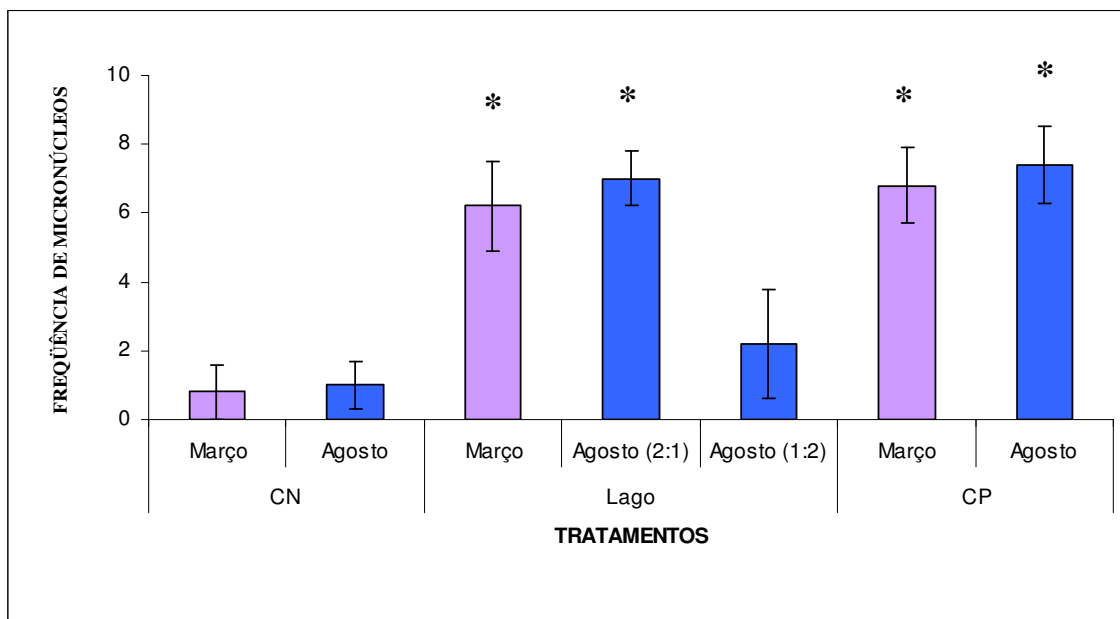


Figura 1. Micronúcleos e outras alterações nucleares encontrados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 96 h de exposição em amostras de água de um ambiente lântico. **A** e **B.** eritrócitos micronucleados (setas); **C.** núcleo do tipo “broken-egg” (seta); **D** e **E.** núcleo do tipo “lobed” (setas); **F.** núcleo do tipo “notched” (seta); **G.** núcleo do tipo “blebbed” (seta). **H.** eritrócito em processo de morte celular (seta); **I.** núcleo heteroploide (seta).

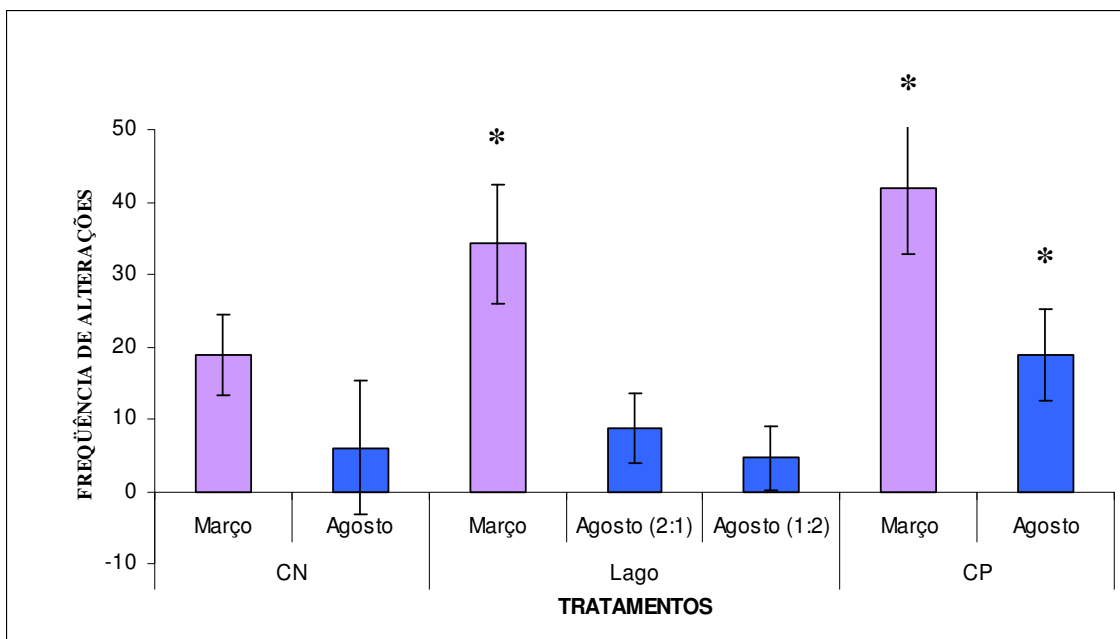
Figura 2



* valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis.

Figura 2. Distribuição dos valores obtidos para micronúcleos, em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 96 h, às águas de um ambiente lântico. Coletas: março e agosto/2007.

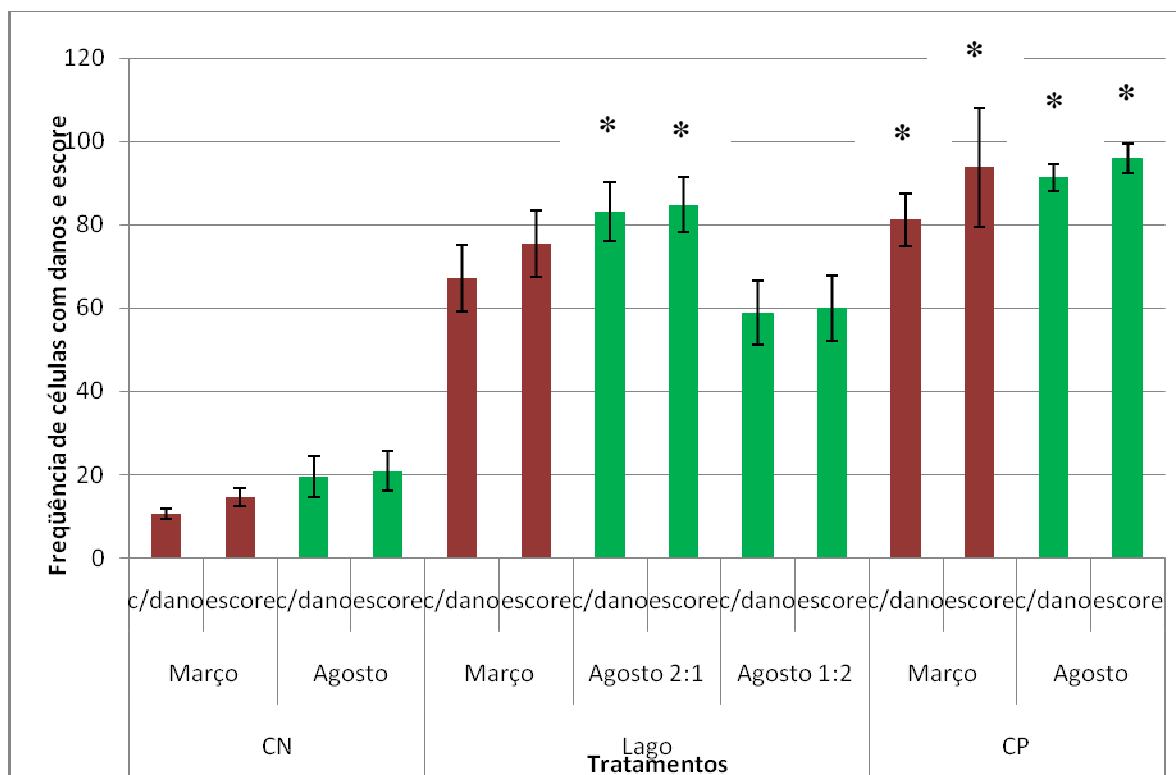
Figura 3



* valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis.

Figura 3. Somatória das alterações nucleares induzidas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos a 96 h, às águas oriundas de um ambiente lântico. Coletas: março e agosto/2007.

Figura 4



* valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Kruskal-Wallis.

Figura 4. Distribuição dos valores obtidos para a frequência de células com danos e o escore, em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 96 h, às águas oriundas de um ambiente lântico. Coletas: março e agosto/2007.

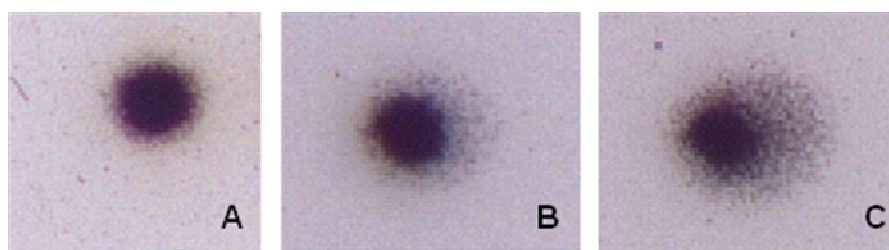


Figura 5. Ensaio do cometa aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição por 96 h, às águas oriundas de um ambiente lântico. **A.** classe 0 (sem dano aparente), **B.** classe 1 (DNA com baixo nível de dano), **C.** classe 2 (DNA com nível médio de dano). Aumento: 400x.

O uso do *Allium test* para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de um ambiente lêntico - Um estudo de caso.

Cintya Ap. Christofolletti, Carmem S. Fontanetti*

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Av. 24-A, nº1515, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autora para correspondência: Tel: +55 19 35264139; +55 19 35264135.

E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Resumo

Este trabalho é o resultado das análises das águas de um ambiente lântico (Lago Azul, Rio Claro-SP), cujo espaço é tido como área de recreação, lazer e pesca. As coletas foram realizadas durante o inverno (estação seca) e o verão (estação chuvosa), entre os anos de 2006 a 2008. Análises físico-químicas foram realizadas em duas amostras, uma de inverno e outra de verão. Testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foram realizados com sementes de *Allium cepa*, submetidas ao tratamento contínuo e a um período de recuperação. No primeiro, as sementes foram submetidas à germinação em amostras de águas do lago, em água ultra-pura (controle negativo), em MMS e trifluralina (controles positivos); no segundo, parte das raízes foram transferidas para água ultra pura, por 48 horas. Os resultados obtidos sugerem um comprometimento das águas do lago por contaminantes derivados de ações antrópicas. Alto potencial citotóxico foi detectado na estação chuvosa, evidenciado pelo elevado índice mitótico e pela presença de células em processo de morte celular, para o tratamento contínuo; houve um decréscimo destes parâmetros, após o período de recuperação. Os potenciais genotóxico e mutagênico foram evidenciados em todas as coletas, em ambas as estações, nos dois tratamentos. Os dados obtidos pelas análises físico-químicas mostraram que as águas possuem valores de Ag, Al³⁺, Cd²⁺, Cu, Fe³⁺ e Hg, acima dos estabelecidos pela legislação. Devido à influência da sazonalidade na dinâmica do lago, acredita-se que houve um maior carregamento de substâncias citotóxicas e uma diluição das concentrações de metais pelas águas pluviais, na estação chuvosa. Na estação seca, durante a estiagem, com a perda do volume de águas, houve uma maior interação entre os elementos encontrados no sedimento e a coluna de água, o que explica as elevadas concentrações de Al e Hg nas águas do lago neste período. Logo, infere-se que a contaminação por metais e a sazonalidade tenham influenciado nos resultados obtidos.

Palavras chave: micronúcleos, aberrações cromossômicas, índice mitótico, ambiente lântico, *Allium cepa*.

1. Introdução

Com a formação dos grandes centros urbanos e industriais, com uma crescente necessidade da disponibilidade de água (lagos, lagoas, rios, entre outros), para distintas finalidades (abastecimento, irrigação, geração de energia, navegação e lazer), fez com que houvesse um aumento das descargas poluidoras, que acabaram contribuindo para o aumento dos problemas decorrentes da redução da qualidade das águas, com uma conseqüente deterioração do ambiente aquático (ESTEVES, 1998; MORAES; JORDÃO, 2002).

Logo, a poluição ambiental aquática é um problema grave e de infinitas dimensões. A investigação de agentes ambientais com potencial mutagênico tornou-se alvo de um crescente número de estudos, uma vez que águas contaminadas mostraram a capacidade de induzir danos genéticos em plantas, organismos aquáticos e mamíferos (GRANT, 1994; MINISSI; LOMBI, 1997; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

Estudos que avaliem a qualidade da água e contribuam para a melhoria dos ecossistemas aquáticos são de grande importância. Testes de toxicidade e genotoxicidade têm sido realizados conjuntamente às análises físicas e químicas, a fim de estabelecer tal qualidade (SMAKA-KINCL et al., 1996; CLAXTON et al., 1998; OHE et al., 2003; EGITO et al., 2007).

A utilização de plantas superiores como organismo-teste fornece valiosos sistemas de ensaios genéticos, com o intuito de diagnosticar e monitorar os poluentes ambientais (GRANT, 1994). Testes com plantas são altamente sensíveis a muitos poluentes ambientais, incluindo metais pesados (FISKEJÖ, 1988; STEINKELLNER et al., 1998) e tem sido usado para o monitoramento de amostras complexas, como as águas de rios (RANK; NIELSEN, 1998; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; EGITO et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008), lagos (GRISOLIA et al., 2005), esgotos industriais e domésticos (GROVER; KAUR, 1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004) e solos contaminados (COTELLE et al., 1999).

As características que tornam *A. cepa* um excelente organismo-teste incluem o conhecimento da duração de seu ciclo celular, a sua resposta a inúmeros mutágenos conhecidos, cromossomos em número reduzido ($2n=16$), a disponibilidade o ano todo e o fácil manuseio. As células meristemáticas das raízes de *A. cepa* podem quantificar uma série de parâmetros morfológicos e citogenéticos, incluindo a morfologia e o crescimento da raiz, a

determinação do índice mitótico, a indução de micronúcleos e de metáfases, anáfases e telófases aberrantes (GRANT, 1994; EVSEEVA et al., 2003; EGITO et al., 2007).

Diante da escassez de estudos com águas de ambientes lênticos e de sua ação na fauna e na flora presentes, este estudo objetivou avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um lago (Lago Azul, Rio Claro-SP), por meio do sistema-teste de *A. cepa*.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização da área de estudo

As águas utilizadas são oriundas de um lago artificial, Lago Azul (22° 23' 25.79''S / 47° 33' 48.01''W), Rio Claro, interior do estado de São Paulo (Figura 1). Este lago foi construído em 1970, pelo represamento do córrego da Servidão, para contribuir com a drenagem e a regularização do mesmo, buscando evitar enchentes nesta região da cidade (TANAKA, 2001). Possui uma área de 3,56 hectares; atualmente, com 110.000 m² de área verde, serve como área de recreação e lazer, incluindo práticas de atividades pesqueiras. Acredita-se que, por escoamento de águas pluviais, recebe também substâncias derivadas de gasolina e álcool, devido às lavagens e possíveis vazamentos de vários postos de combustíveis presentes em seu entorno. Problemas de inundação, infiltração, erosão e contaminação das águas por esgoto ocorrem em diferentes pontos do córrego e também no lago, mesmo depois da canalização.

2.2 Coleta das amostras

A água utilizada no presente trabalho foi coletada em dois períodos no ano, levando-se em conta a estação chuvosa, delimitada na região de Rio Claro pelos meses dezembro a março e, pela estação seca, nos meses de junho a setembro, para os anos de 2006 a 2008. Foram realizadas um total de quatro coletas, duas para cada estação. As amostras de água foram coletadas numa profundidade de 30 cm, sendo levadas imediatamente ao Departamento de Biologia da UNESP – Campus de Rio Claro, onde foram mantidas a 4°C, até o início dos experimentos.

Dados meteorológicos foram mensurados, para todos os meses de coleta, junto ao Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA), da UNESP de Rio Claro.

2.3 Determinação da concentração de metais pesados

A análise química das amostras de água foi realizada, concomitantemente, com os ensaios biológicos, para a coleta de agosto de 2007 e fevereiro de 2008.

As amostras foram levadas ao laboratório ASL, em frascos de plástico próprios para coleta, lavados com HNO₃ 1N. A concentração dos metais Ag, Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Ni, Pb e Zn foi determinada pelo método USEPA-SW 846.

2.4 Bioensaios com *A. cepa*

Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em águas oriundas do Lago Azul, à solução de 10 µL/mL de metilmetano sulfonato[®] (CAS N°66-27-3) e a 0,84 ppm de trifluralina[®] (CAS N°1582-09-8), para controles positivos e em água ultra pura, para controle negativo.

Os ensaios foram realizados em placas de Petri, contendo aproximadamente 100 sementes de uma única variedade de *A. cepa*, para que não houvesse diferentes respostas durante o andamento dos bioensaios.

As sementes permaneceram nessas placas até atingirem 2 cm de comprimento, tido como tratamento contínuo. Decorrido este tempo, foram coletadas algumas raízes de cada ensaio e o restante delas foi transferido para placas contendo água ultra pura, por um período de recuperação de 48 horas, quando foram realizadas novas coletas das raízes, para a confecção de lâminas e posterior análise citogenética.

A fixação das raízes foi feita em Carnoy 3:1 (3 partes álcool etílico PA: 1 parte de ácido acético glacial PA) por 6 h, sendo, após este período, transferidas para um novo fixador, onde foram conservadas em geladeira, até sua utilização.

Para a realização das análises citológicas, as raízes foram submetidas à reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978). Após a reação de Feulgen, cortou-se o meristema. Gotas de carmim acético 2% foram pingadas sobre o material, sendo utilizadas como contra-corante e também para facilitar o espalhamento das células. Todas as lâminas foram obtidas submetendo os meristemas radiculares a um esmagamento suave entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas foram montadas em Permout, para serem posteriormente observadas ao microscópio.

2.4.1 Indução de efeitos citotóxicos

Para a avaliação das lâminas por meio da técnica citogenética convencional, o potencial citotóxico foi avaliado pelo índice mitótico, calculado pela razão de células em divisão e o total de células analisadas x 100. Considerou-se também a presença de células em processo de morte celular.

2.4.2 Indução de aberrações cromossômicas e nucleares

Para a avaliação do potencial genotóxico e mutagênico das águas do lago, células em intérfase e em divisão foram examinadas para avaliar a indução de aberrações cromossômicas e nucleares, tais como: C-metáfases, metáfases poliplóides e com aderência cromossômica, anáfases (multipolares, com pontes e atraso cromossômico, fragmentos e perda cromossômica), telófases anormais (com pontes, perda e atraso cromossômico), micronúcleos e brotos nucleares.

2.4.3 Análise estatística

Foram analisadas 1000 células meristemáticas de *A. cepa* por lâmina (totalizando cerca de 5.000 células para cada tratamento). A análise estatística dos dados foi realizada pelo método estatístico de Mann-Whitney.

3. Resultados

3.1 Resultados obtidos nas análises físico-químicas e dados meteorológicos

Foram detectadas elevadas concentrações de Ag, Cd²⁺, Cu, Fe³⁺, nas duas amostras analisadas. Na amostra da estação seca foram detectados ainda altos índices de Al³⁺ e Hg (tabela 1). Tais valores se encontram acima dos limites estabelecidos pela portaria 357/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

Os parâmetros de DBO, DQO, sólidos totais dissolvidos, condutividade elétrica, carbono orgânico total, turbidez, nitrito e nitrato também variaram para as duas estações. Os dados meteorológicos obtidos pelo CEAPLA mostraram as variações ocorridas durante as estações, caracterizando bem a estação chuvosa e seca na cidade de Rio Claro-SP (tabela 2).

3.2 Indução dos efeitos citotóxicos

Observou-se um aumento dos valores obtidos para o índice mitótico, nas amostras de águas do lago, estatisticamente significativas quando comparadas ao controle negativo, nas duas coletas realizadas na estação chuvosa (tabela 3). Houve uma diminuição destes valores, estatisticamente significativa, após o período de recuperação. Em uma das amostras da estação chuvosa (março/2007), observou-se no tratamento contínuo, células em processo de morte celular (Figura 1L), num percentual de 0,82%. Após o período de recuperação, houve o restabelecimento da homeostase celular, não sendo mais observadas células em processo de morte. Em uma das amostras da estação seca (agosto/2007), notou-se uma redução dos valores obtidos para o índice mitótico, estatisticamente significativo, para as amostras de águas do lago, no período de recuperação.

3.3 Indução das aberrações cromossômicas e nucleares

Nos testes conduzidos com células meristemáticas de *A. cepa*, células micronucleadas (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D) e células portadoras de quebras cromossômicas (Figura 1I) foram analisadas e contabilizadas conjuntamente para a avaliação do potencial mutagênico. A análise estatística revelou efeito mutagênico nos controles positivos e nas amostras de águas coletadas nas duas estações, tanto no tratamento contínuo como no período de recuperação, quando comparados ao controle negativo (tabela 4), exceto na coleta de fevereiro/2008.

Na avaliação do potencial genotóxico, considerou-se a somatória das alterações cromossômicas e nucleares (tabela 4). Para as amostras de águas do lago, em ambas as estações, tanto no tratamento contínuo quanto no período de recuperação, observou-se a presença de células portadoras de brotos nucleares (Figura 1B), células poliplóides (Figura 1E), metáfase com perda cromossômica (Figura 1F), C-metáfases (Figuras 1G e 1H), anáfase com ponte cromossômica (Figura 1J) e telófase com atraso cromossômico (Figura 1K) (dados não mostrados).

A somatória destes índices, para as amostras de águas do lago, foram estatisticamente significativos, quando comparados ao controle negativo, nas duas estações de coletas, tanto no tratamento contínuo quanto no período de recuperação (tabela 4).

4. Discussão

Estudos que visam conhecer a dinâmica e o metabolismo dos ecossistemas aquáticos continentais são de difícil interpretação, uma vez que envolvem o estudo de muitas variáveis, sejam elas físicas, químicas, biológicas ou de origem antropogênica.

O lago tido por modelo de estudo, é um lago artificial, criado pelo represamento de um córrego que corta alguns bairros da cidade. Por situar-se em um fundo de vale, este lago recebe toda a carga pluvial desses bairros. Por tempo indeterminado, recebeu efluentes de uma lavanderia industrial e despejos domésticos, provenientes de galerias clandestinas.

As análises físico-químicas indicam que, na estação seca, houve um aumento dos valores de DBO, DQO, nas águas do lago. Isto sugere uma maior concentração de poluentes, devido à escassez de chuvas, resultante do despejo de matéria orgânica, provavelmente associada a despejos de origem doméstica. Dados semelhantes foram observados por Mitteregger-Júnior et al. (2006), que avaliaram a genotoxicidade e a toxicidade das águas e do sedimento de uma área influenciada por curtumes, durante o inverno de 2003 e o verão de 2004.

A análise de metais apresentou poucas diferenças entre as estações de verão e inverno, uma vez que Ag, Cd, Cu e Fe se encontraram acima dos valores permitidos pelo CONAMA, para ambas as estações. Somente para a estação seca, observa-se a presença de Al e Hg, com valores acima do permitido pela legislação.

A distribuição dos elementos e/ou compostos químicos, sejam eles contaminantes ou não, nos ambientes aquáticos, são controladas por processos químicos, físicos e biológicos que, acabam determinando sua concentração na coluna de água, nos sólidos suspensos e nos sedimentos (SÁ, 2003; SANTOS et al., 2006).

O aumento dos valores de Al e Hg nas águas do lago, na estação seca, podem ser explicados pela perda do volume de água, comum à maioria dos reservatórios de água do estado de São Paulo, durante a estiagem, provocando uma maior interação do sedimento com a coluna d'água. De acordo com Esteves (1998), em lagos muito rasos ou em áreas de alagamento temporário, há a liberação de elementos mineralizados no sedimento. Ainda de acordo com este mesmo autor, esta característica é marcadamente sazonal. Assim sendo, infere-se que há a liberação dos metais do sedimento para a água, na estação seca. Em contrapartida, provavelmente ocorra uma diluição da concentração desses elementos durante o período de chuvas, demonstrado por sua baixa incidência na estação chuvosa.

O organismo-teste escolhido para este estudo foi eficiente na detecção dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do lago em estudo. Plantas superiores têm sido frequentemente utilizadas no biomonitoramento ambiental, com o intuito de diagnosticar os efeitos citotóxicos e também genotóxicos de mutágenos ambientais, tanto “in situ” quanto em laboratório (GRANT, 1994; EGITO et al., 2007). De acordo com Fiskejö (1993), resultados positivos em plantas superiores indicam a presença de substâncias citotóxicas e/ou genotóxicas no ambiente e, os riscos diretos e/ou indiretos, aos quais todos os organismos estão expostos.

As sementes de *A. cepa* que foram submetidas à germinação em amostras de águas do lago, tiveram um aumento do valor obtido para o índice mitótico, estatisticamente significativo, no tratamento contínuo, para a estação chuvosa. Suspeita-se que houve um carregamento de substâncias citotóxicas pelas águas das chuvas, que estimularam o processo de divisão celular das sementes. Na coleta de março/2007, também foi detectada a presença de células em processo de morte celular, para o tratamento contínuo. A indução da divisão celular causada por essas águas, possivelmente, ocasionou uma proliferação descontrolada das células, levando algumas ao processo de morte celular. Após o período de recuperação, houve uma restauração dos valores obtidos para o índice mitótico e não observou-se células em processo de morte. Tais dados mostram que, cessando a exposição, cessa também o efeito citotóxico. De acordo com Hoshina (2002) e Caritá; Marin-Morales (2008), um aumento ou uma diminuição do índice mitótico pode ser um bom indicador dos níveis de poluição, empregados no monitoramento de ambientes impactados, especialmente aqueles contaminados com compostos potencialmente tóxicos e/ou citotóxicos.

Em uma das coletas de ambas as estações, houve uma redução dos valores obtidos no índice mitótico, para as águas do lago, estatisticamente significativo, quando comparado ao controle negativo, no período de recuperação. Essa redução pode ser decorrente da ação de metais que, mesmo após o período de recuperação, demonstram a sua capacidade de inibir o processo de divisão celular das células vegetais (FISKEJÖ, 1988).

Quanto à genotoxicidade dessas águas, uma elevada frequência de aberrações cromossômicas foram observadas, nos dois tratamentos em ambas as estações. De acordo com Natarajan (2002), as aberrações cromossômicas são tidas como importantes eventos decorrentes das ações genotóxicas de agentes químicos, aos quais diversos organismos estão expostos, inclusive o homem. Estudos epidemiológicos têm relacionado a elevada frequência de aberrações cromossômicas na população humana ao risco significativo de desenvolvimento de neoplasias (OBE et al., 2002).

As alterações mais observadas, embora não tenham sido significativas para todos os meses de coleta, foram células portadoras de C-metáfases, brotos nucleares, aderências, pontes e perdas cromossômicas, nas duas estações, em ambos os tratamentos. Alterações como a C-metáfase e a aderência cromossômica são tidas como um mecanismo causador de sérios danos e um dos parâmetros utilizados na avaliação dos efeitos genotóxicos (FISKEJÖ, 1985; 1988; TÜRKOGLU, 2007; 2008).

Segundo Gömürgen (2005), pontes cromossômicas podem ocorrer como consequência da aderência e uma subsequente falha na separação dos cromossomos na anáfase ou ainda ser atribuída a uma translocação desigual ou inversão dos segmentos cromossômicos. Essas pontes podem resultar em perda cromossômica quando quebram, uma vez que decorrem da inativação do fuso mitótico durante o ciclo de divisão celular, devido à um efeito aneugênico (UHL et al., 2003).

De acordo com a literatura, tais alterações podem ser decorrentes da ação de certos metais pesados. Atualmente há um grande interesse em estudos que avaliem os danos causados aos organismos pelos metais pesados, uma vez que a contaminação por tais elementos vêm aumentando com o desenvolvimento da indústria moderna (MARCANO et al., 2002).

Estudos realizados por Fiskejö (1988; 1993), Dovgalyuk et al. (2003), Marcano et al. (2002) demonstram que alguns metais são capazes de provocar distúrbios nos processos mitóticos e de citocinese. Observaram que diferentes metais possuem diferentes efeitos na organização microtubular das células de plantas.

O alumínio (Al) é um metal altamente citotóxico para as plantas (PEJCHAR et al., 2008). Alguns estudos mostram que o Al interfere na cinética de divisão celular, pois possui como alvo, os microtúbulos (FISKEJÖ, 1983; VOUTSINAS et al., 1997).

A prata (Ag) é um metal não essencial que, quando está presente em elevadas concentrações no ambiente aquático, intoxica os organismos, sendo que a forma iônica deste metal é, geralmente, a mais tóxica. Estudos realizados com peixes e crustáceos relatam que a Ag está relacionada a um desequilíbrio iônico e osmorregulatório, associado às inibições da atividade da Na^+/K^+ -ATPase e da captação de Na^+ em nível branquial (GROSSEL et al., 2002).

Dovgalyuk et al. (2003) demonstraram que o cádmio (Cd) foi capaz de causar distúrbios nos processos mitóticos e de citocinese, em células meristemáticas de cebola, devido aos danos provocados nos microtúbulos do fuso mitótico e do fragmoplasto, através de técnicas imunocitoquímicas, em células tratadas com tais metais.

Em estudos realizados por Fiskejö (1988), bulbos de *A. cepa* tratados com cloreto de cádmio (CdCl_2) apresentaram elevadas frequências de aderência cromossômica e C-metáfases. Esse mesmo autor testou ainda diversas concentrações de sulfato de cobre (CuSO_4) e pode concluir que o cobre (Cu) foi o mais tóxico. Também observou a presença de aderência cromossômica, poucas C-metáfases e uma diminuição dos valores obtidos para o índice mitótico com o aumento das concentrações de CuSO_4 .

O ferro (Fe) é tido como elemento essencial para todas as formas de vida, uma vez que é um componente chave na manutenção da homeostase celular. Inúmeros processos biológicos são intermediados por enzimas que requerem o ferro como co-fator (PEDROZO; LIMA, 2001). O excesso de ferro no ambiente pode estar associado à peroxidação lipídica das membranas e, conseqüentemente ao estresse oxidativo. Segundo Offer et al. (2005), a indução de lesões no DNA, tais como as quebras de fita dupla e aumento na frequência de micronúcleos foram descritos em indivíduos com alfa ou beta-talassemia, cujo estresse oxidativo exacerbado foi mediado pela presença de altas concentrações plasmáticas de ferro.

O mercúrio (Hg) é considerado um poluente de alto risco. A queima de combustíveis fósseis é considerada uma fonte de mercúrio. Estudos conduzidos em plantas e animais de laboratório mostraram que o mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, levando a uma distribuição anormal dos cromossomos e poliploidia. Esta ação resultaria da forte afinidade do mercúrio pelos grupos sulfidrilas encontrados nas proteínas do fuso (De FLORA et al., 1994; CARDOSO et al., 2002).

Todas as alterações observadas no presente estudo decorrem da ação de substâncias capazes de intervir na cinética de divisão celular, afetando a formação e/ou arranjo dos microtúbulos, estruturas essenciais para a formação do fuso mitótico. Portanto, a propriedade aneugênica dos metais, provavelmente, seja um dos fatores responsáveis pela presença das alterações observadas.

O período de recuperação, em água ultra pura, colaborou para minimizar os efeitos genotóxicos das águas do lago, uma vez que houve uma diminuição dos valores obtidos para o total de alterações cromossômicas, para as amostras de águas do lago, em ambas as estações, embora estes valores ainda sejam estatisticamente significativos, quando comparado ao controle negativo. De acordo com Hoshina (2002) o período de recuperação realizado com os meristemas radiculares, submetidos à germinação em águas de rios que recebem efluentes domésticos, mostram uma redução das alterações cromossômicas em *A. cepa*, uma vez que seus efeitos podem ser minimizados, quando houver uma recuperação da qualidade de suas águas.

A presença de células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas também foi observada, para as amostras de águas do lago, nas duas estações e nos dois tratamentos. O tamanho dos micronúcleos observados para as amostras de águas do lago foi semelhante ao tamanho dos micronúcleos observados para a trifluralina. Sabe-se que a trifluralina é um herbicida de ação aneugênica (FERNANDES et al., 2007).

Yamamoto; Kikuchi (1980) demonstraram que, medindo o diâmetro dos micronúcleos era possível determinar se o agente possuía ação clastogênica ou aneugênica. Os autores observaram que os micronúcleos produzidos por agentes clastogênicos eram, de maneira geral, menores que aqueles derivados de ação aneugênica. De acordo com Grant (1982), a espécie *A. cepa* se destaca pelo seu padrão cariotípico simétrico, o qual apresenta homogeneidade quanto ao tamanho de seus cromossomos. Desta forma, a metodologia proposta por Yamamoto; Kikuchi (1980), para a detecção das ações aneugênica e/ou clastogênica de uma substância em relação ao tamanho de micronúcleos, pode ser válido para *A. cepa*.

Estudos realizados por Leme et al. (2008), com radículas de *A. cepa* expostas às águas impactadas por vazamento de petróleo, na bacia do rio Guaecá, demonstraram que o tamanho variado dos micronúcleos com diferentes graus de condensação, sugerem que o petróleo, por ser uma mistura complexa de hidrocarbonetos, pode ter tanto uma ação aneugênica quanto clastogênica.

Diferentemente dos resultados obtidos por Leme et al. (2008), os micronúcleos observados para as águas do lago, provavelmente decorrem da ação aneugênica dos metais encontrados nestas águas, uma vez que todos apresentavam tamanhos semelhantes àqueles observados para a trifluralina.

O período de recuperação, em água ultra pura, não foi eficiente para minimizar os efeitos mutagênicos dessas águas. Tais resultados sugerem que, os danos provocados durante o tratamento contínuo não foram restaurados, e persistiram após vários ciclos de divisão celular, mesmo em água ultra pura. Logo, a existência de células micronucleadas e portadoras de quebras cromossômicas indicam que as águas do Lago Azul apresentam potencial mutagênico.

5. Conclusão

No presente estudo, *A. cepa* se mostrou um eficiente organismo-teste para avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico. Os

resultados obtidos revelaram que as águas do lago apresentam elevadas concentrações de metais Ag, Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu, Fe^{3+} e Hg, detectadas pelas análises físico-químicas. Essas águas apresentam ainda uma potencialidade citotóxica, genotóxica e mutagênica, pois foram capazes de induzir alterações no material genético do organismo-teste utilizado. O tratamento de recuperação, em água ultra pura, por 48 horas, mostrou-se eficiente para minimizar os efeitos genotóxicos das águas do lago, mas não foi suficiente para minimizar os efeitos mutagênicos. Acredita-se que a possível contaminação por despejos de origem doméstica e a sazonalidade, pela dinâmica da troca de elementos do sedimento para a água, durante a estação seca e o carreamento de substâncias citotóxicas e diluição dos metais pesados pelas águas pluviais, na estação chuvosa, tenham influenciado nos resultados obtidos.

Agradecimentos

Agradecemos a FUNDUNESP (Fundação para o desenvolvimento da UNESP) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro, ao administrador do Lago Azul, Sr. Marcuci, pelo suporte técnico e a Prefeitura de Rio Claro/SP, na pessoa do Sr. Antonio Fernando David Reginato, secretário de Agricultura, Abastecimento e Silvicultura, pela autorização das coletas.

Referências Bibliográficas

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

CARDOSO; P.C.S.; LIMA, P.L.; BAHIA, M.O.; AMORIM, M.I.M.; BURBANO, R.R.; FARIAS, R.A.F. **Efeitos biológicos do mercúrio e seus derivados em seres humanos – uma revisão bibliográfica**. Belém: Universidade Federal do Pará. Disponível em: http://www.facome.uqam.ca/pdf/cardoso_2002.PDF. Acesso em 18 de junho de 2008.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberration in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v.72, p.722-725, 2008.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L.K.S.; MURTHY, R.C.; SAXENA, P.N.; PANDE, P.N.; GUPTA, S.K. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of Total Environment**, Amsterdam, v.347, p.46-52, 2005.

CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; HUGHES, T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, Amsterdam, v.410, p.237-243, 1998.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio ambiente. Resolução 357/2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em: 19 de maio de 2008.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F.; FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v.426, p.167-171, 1999.

De FLORA, S; BENNICELLI, C e BAGNASCO, M - Genotoxicity of mercury compounds: A review. **Mutation Research**. Amsterdam, v.317, p.57-79, 1994.

DOVGALYUK, A.; KALYNYAK, T.; BLUME, Y.A.B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. **Cell Biology International**, London, v.27, p.193-195, 2003.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, n.2, p.435-441, 2007.

ESTEVEZ, F.A. Fundamentos de Limnologia. **Editora Interciência**, Rio de Janeiro, 2ª edição, 1998, 602 p.

EVSEEVA, T.I.; GERAS'KIN, S.A.; SHUKTOMOVA, I.I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v.68, p.235-248, 2003.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.88, p.252-259, 2007.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v.102, p.99-112, 1985.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – An alternative in environmental studies – the relative toxicity of metal-ions. **Mutation Research**, Amsterdam, v.197, p.243-260, 1988.

FISKEJÖ, G. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v.8, p.291-298, 1993.

GÖMÜRGEN, A.N. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. **Cytologia**, Tokyo, v.70, p.119-128, 2005.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium cepa*. A report of the US Environmental Protection Agency: Genotox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v.99, p.273-291, 1982.,

GRANT, W.F. The present status of higher-plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, p.175-185, 1994.

GRISOLIA; C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v.491, p.39-41, 2001.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, A.B.B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.2, p.334-338, 2005.

GROSSEL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v.133, p.287-303, 2002.

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

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro, município de Rio Claro, pertencente à Bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. 52f. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v.88, p.214-219, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water- A case study. **Mutation Research**, Amsterdam, v.650, p.80-86, 2008.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. **Environmental Research**, San Diego, Section A, v.88, p.30-35, 2002.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, Tokyo, v.69, n.4, p.399-408, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.1, p.148-158, 2006.

McCRARY, J.K.; CASTRO, M.; McKAYE, K. Mercury in fish from two Nicaraguan lakes: a recommendation for increased monitoring of fish for international commerce. **Environmental Pollution**, Barking, v.141, p.513-518, 2006.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.30, p.665-676, 1978.

MITTEREGGER-JÚNIOR, H.; FERRAZ-DIAS, J.; LÚCIA-YONEMA, M.; ARENZON, A.; SILVA, J.; PEGAS-HENRIQUES, J.A. Avaliação das atividades tóxicas e mutagênicas da água e do sedimento do arroio Estância Velha, região coureira-calçadista, utilizando *Allium cepa*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v.1, n.2, p.147-151, 2006.

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, Amsterdam, v.393, p.17-21, 1997.

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**, Amsterdam, v.339, p.135-147, 1998.

MOITA, L.R. **O papel das lâminas d'água no espaço urbano: atração ou repulsão. O caso do Lago Azul de Rio Claro, SP.** 2007. 196 f. Dissertação (Mestrado em Geografia), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 2007.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, Amsterdam, v.504, p.3-16, 2002.

OBE, M.G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHHANES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, Amsterdam, v.504, p.17-36, 2002.

OBERHOLSTER, P.J.; BOTHA, A.-M.; CLOETE, T.E. Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. **Environmental Pollution**, Barking, p. 1-9, 2008 (*in press*)

OFFER, T.; BHAGAT, A.; LAL, A.; ATAMNA, W.; SINGER, S. T.; VICHINSKY, E. P.; KUYPERS, F. A.; AMES, B. N. Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1054, p.439-444, 2005.

OHE, T.; WHITE, P.A.; DeMARINI, D.M. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. **Mutation Research – Genetics Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v.534, p.101-112, 2003.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. Ecotoxicologia do ferro e seus compostos. **Série Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador, v.4, 2001, 122 p.

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, London, v.32, p.554-556, 2008.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.418, p.113-119, 1998.

SÁ, F. Distribuição e fracionamento de contaminantes nos sedimentos superficiais e atividades de dragagem no complexo estuarino da Baía de Paranaguá (PR). **Boletim Paranaense de Geociências**, Editora UFPR, n.53, p.83-92, 2003.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R. FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: **Mutagenese Ambiental** (Org). Canoas: Ulbra, p.201-224, 2003.

SANTOS, D.M.; BOSSINI, J.A.T.; PREUSSLER, K.H.; VASCONCELOS, E.C.; CARVALHO-NETO, F.S.; CARVALHO-FILHO, M.A.S. Avaliação de metais pesados na Baía de Paranaguá, PR, Brasil, sob influência das atividades antrópicas. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v.1, n.2, p.157-160, 2006.

SMACKA-KINCL, V.; STEGNAR P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v.368, p.171-179, 1996.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v.605, p.87-93, 2006.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.31, p.183-191, 1998.

SUDHAKAR, D.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.203, p.11-21, 1998.

TANAKA, P.R. **O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro-SP)**. 2001. 40f. Universidade Estadual Paulista (Trabalho de conclusão de curso), UNESP, Rio Claro, 2001.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives teste don root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, Amsterdam, v.626, p.4-14, 2007.

TÜRKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root mesistem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, 2008 (*in press*)

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: MALUSZYNKA, J.; PLEWA, M. (Org.). **Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and Human Health: a couse manual**. Katowice, p.11-30, 2003.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.43, p.284-291, 2002.

VOUTSINAS, G. ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell Biology International**, London, v.21, n.7, p.411-418, 1997.

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

Tabela 1. Comparação dos valores obtidos para as análises físico-químicas das águas superficiais do Lago Azul, para as coletas de agosto/2007 e fevereiro/2008.

Parâmetros Analíticos	CONAMA	Agosto/2007	Fevereiro/2008	Método	Limite de detecção
Ag (mg/L)	0,01	<0,09*	<0,09*	USEPA-SW 846	0,090
Al (mg/L)	0,1	0,695*	<0,050	USEPA-SW 846	0,050
As (mg/L)	0,01	<0,01	<0,01	USEPA-SW 846	0,010
Cd (mg/L)	0,001	<0,004*	<0,004*	USEPA-SW 846	0,004
Co (mg/L)	0,05	<0,002	<0,002	USEPA-SW 846	0,002
Cu (mg/L)	0,009	<0,025*	<0,025*	USEPA-SW 846	0,025
Cr total (mg/L)	0,05	<0,005	<0,005	USEPA-SW 846	0,005
Fe total (mg/L)	0,3	1,51*	0,379*	USEPA-SW 846	0,030
Hg (mg/L)	0,0002	<0,0006*	<0,0002	USEPA-SW 846	0,0006
Na (mg/L)	NA	9,8	3,8	SMEWW 3500-NA.B	0,1
Ni (mg/L)	0,025	<0,006	<0,006	USEPA-SW 846	0,006
Pb (mg/L)	0,01	<0,002	<0,002	USEPA-SW 846	0,002
Zn (mg/L)	0,18	<0,035	<0,004	USEPA-SW 846	0,004
Cloretos (mg/L)	250	6,67	6,67	USEPA 300.1.321	0,05
DBO (mg/L)	5	13*	4	SMEWW 5210.B	2
DQO (mg/L)	5	45*	<5	SMEWW 5220.D	1,67
pH	6,0 a 9,0	6,8	7,0	SMEWW 4500-H+.B	0,1
Sólidos totais dissolvidos (mg/L)	500	120	64	SMEWW 2540	1
Condutividade elétrica (µS/cm)	NA	500	80,9	SMEWW 2510.B	0,1
COT (mg/L)	NA	14,0	3,3	SMWW 5310.D Oxidação com persulfato - espectrofotômetro	NA
Nitrito (mg/L)	1	<0,15	0,055	USEPA 300.1-321	0,005
Nitrato (mg/L)	10	<0,015	1,12	USEPA 300.1-321	0,05
Turbidez (UNT)	100	63,0	8	SMEWW 2130.B	1

* Valores acima do permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) – portaria 357/2005.

Nota: NA – não aplicável.

Tabela 2. Dados meteorológicos da cidade de Rio Claro–SP referentes aos períodos de coleta das amostras de água de um ambiente lântico, obtidos junto ao CEAPLA – IGCE – UNESP/ Rio Claro.

Período de coleta	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação Total (mm)	Nº total de dias chuvosos
Agosto/2006	29,50	11,32	55,29	14,5	2
Março/2007	31,31	18,81	67,60	123,9	10
Agosto/2007	28,04	11,21	58,32	0	0
Fevereiro/2008	29,71	18,93	73,59	141,1	15

Nota: Os valores acima foram obtidos a partir das médias das medidas diárias.

Tabela 3. Distribuição dos valores obtidos para o índice mitótico em células meristemáticas das raízes de *A. cepa*, submetidas à germinação em amostras de águas oriundas de um ambiente lântico, em água ultra pura (controle negativo), em Trifluralina e em MMS (controles positivos), nas respectivas coletas de 2006 a 2008, para os tratamentos contínuo e de recuperação.

Coletas	Tratamento	Controle			
		Negativo	Lago	MMS	Trifluralina
Agosto/2006	TC	17,94±6,42	16,62±2,13	8,44±0,91**	18,72±5,65
	Rec	12,48±2,46	16,32±2,77	9,18±1,15**	16,32±5,62
Março/2007	TC	8,7±1,4	17,52±2,25*	8,04±0,9	9,22±2,05
	Rec	10,32±3,17	12,72±6,17	9,19±0,9	10,84±3,22
Agosto/2007	TC	11,06±2,94	10,76±0,59	11,1±2,78	9,22±1,76
	Rec	11,48±2,18	8,08±0,60**	9,08±2,41	8,24±1,73**
Fevereiro/2008	TC	13,82±1,41	16,24±1,23**	11,2±2,51	10,88±0,60*
	Rec	19,68±1,72	16,04±1,27**	14,24±1,59**	12,58±1,31*

TC. tratamento contínuo; Rec. período de recuperação em água ultra pura, por 48 horas.

* valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo, pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,01$.

** valores estatisticamente significativos quando comparados ao controle negativo, pelo teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Tabela 4. Alterações potencialmente mutagênicas (micronúcleos e quebras cromossômicas) e genotóxicas (aberrações cromossômicas e nucleares) encontradas em células meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com água ultra pura, MMS, Trifluralina e águas oriundas de um ambiente lântico, para todas as coletas realizadas.

Coletas	Alterações	Tratamento	Controle			
			Negativo	Lago	MMS	Trifluralina
Agosto/2006	Mutagênicas	TC	0,8±0,8	3,2±2,2	16±4,3*	9,2±5,01*
	(MN+QB)	Rec	0,6±0,5	3,4±1,8**	4±1,2*	16±4,06*
	Genotóxicas	TC	1,2±0,8	17,6±1,6*	11,2±3,9*	20,2±3,8*
	(TA)	Rec	1±0,7	15,8±4,4*	4,2±1,7**	17,8±5,3*
Março/2007	Mutagênicas	TC	2,2±0,8	5,2±2,3**	10,2±2,7*	16±5,9*
	(MN+QB)	Rec	2±0	8±2,6*	4,4±0,8*	8,4±3,6*
	Genotóxicas	TC	1,4±1,1	11,2±2,2*	6,4±4,7**	31,4±13,6*
	(TA)	Rec	1,4±0,5	7,4±3,4*	2,4±1,6	17,4±10,01*
Agosto/2007	Mutagênicas	TC	0,6±0,8	8±1,2*	20±5,1*	12,8±2,1*
	(MN+QB)	Rec	0,8±0,4	8,1±4,5*	18±6,4*	18,4±2,1*
	Genotóxicas	TC	4,2±1,09	15±5,8**	9,8±2,5*	13±2*
	(TA)	Rec	3±3,9	9,1±4,6**	9,2±5,9	21,2±6,2*
Fevereiro/2008	Mutagênicas	TC	0,6±0,5	6,4±1,3*	14,8±3,2*	12,2±1,7*
	(MN+QB)	Rec	0,2±0,4	4,4±1,1*	5,6±1,8*	6,4±2,07*
	Genotóxicas	TC	1±0,7	20,8±5,3*	17,8±11,3*	31,6±7,05*
	(TA)	Rec	1±1	15,4±6,6*	13,8±7,04*	11,4±3,5*

TC. Tratamento contínuo; Rec. período de recuperação, em água ultra-pura, por 48 horas; MN. Micronúcleo; QB. Quebra cromossômica; TA. Total de alterações cromossômicas e nucleares.

*valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Mann-Whitney, com $p < 0,01$.

** valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

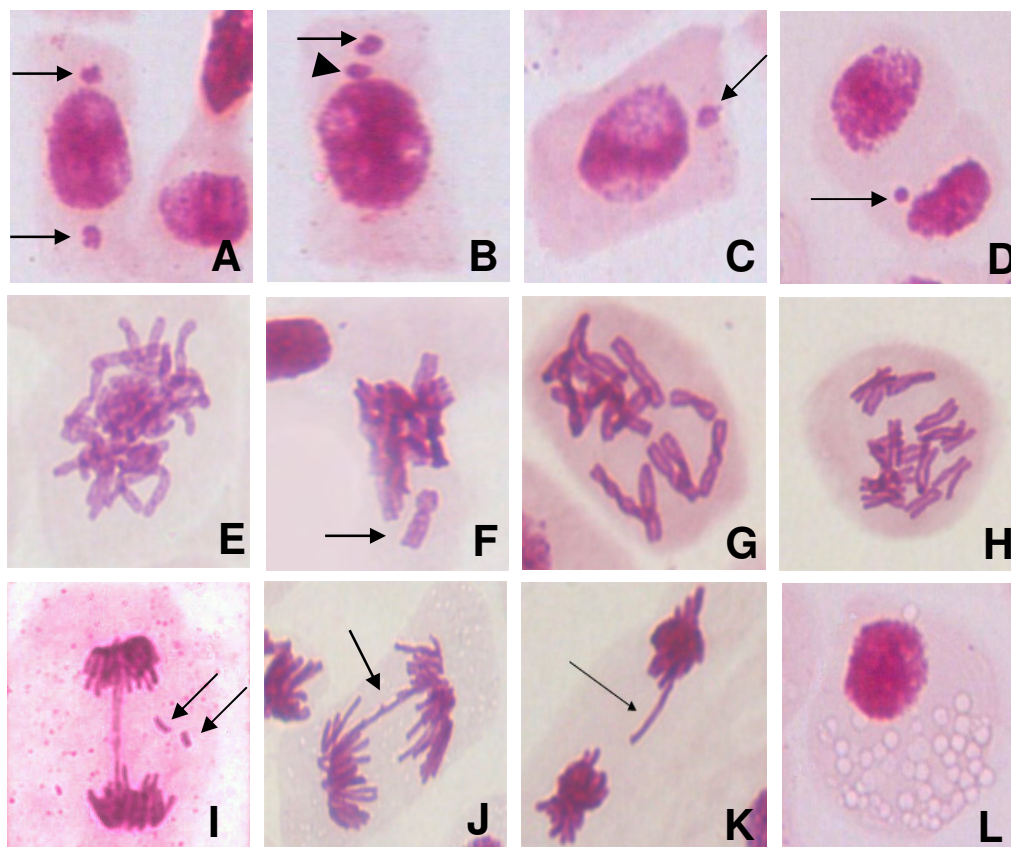
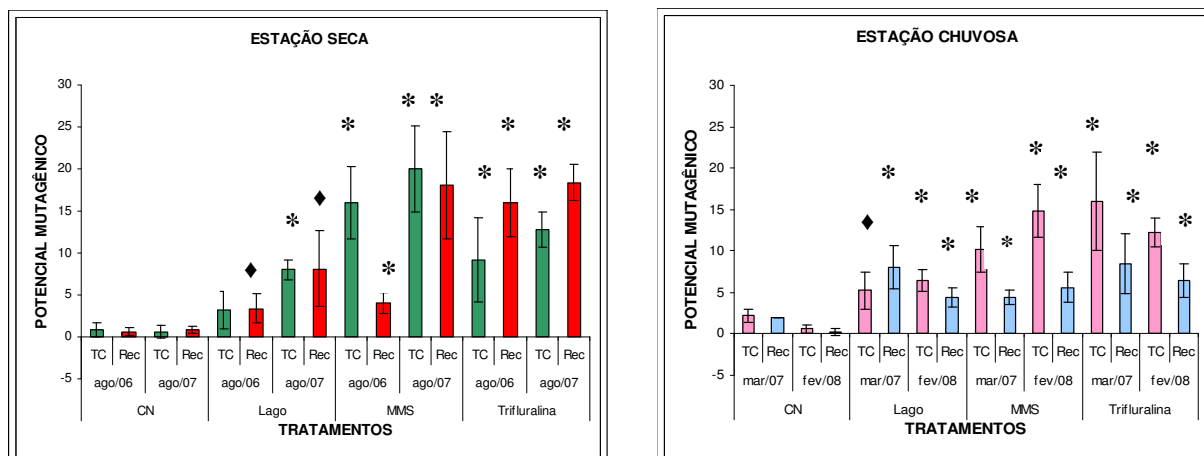


Figura 2. Alterações nucleares e aberrações cromossômicas obtidas pelo sistema-teste de *Allium cepa*, exposto por 96 h às águas oriundas de um ambiente lântico **A, B, C e D.** células micronucleadas (setas) e portadoras de broto nuclear (cabeça da seta); **E.** metáfase poliplóide; **F.** metáfase com perda cromossômica; **G e H.** C-metáfases; **I.** Anáfase com quebras cromossômicas; **J.** anáfase com ponte cromossômica (seta); **K.** telófase com atraso cromossômico (seta); **L.** célula em processo de morte celular.

Figura 3

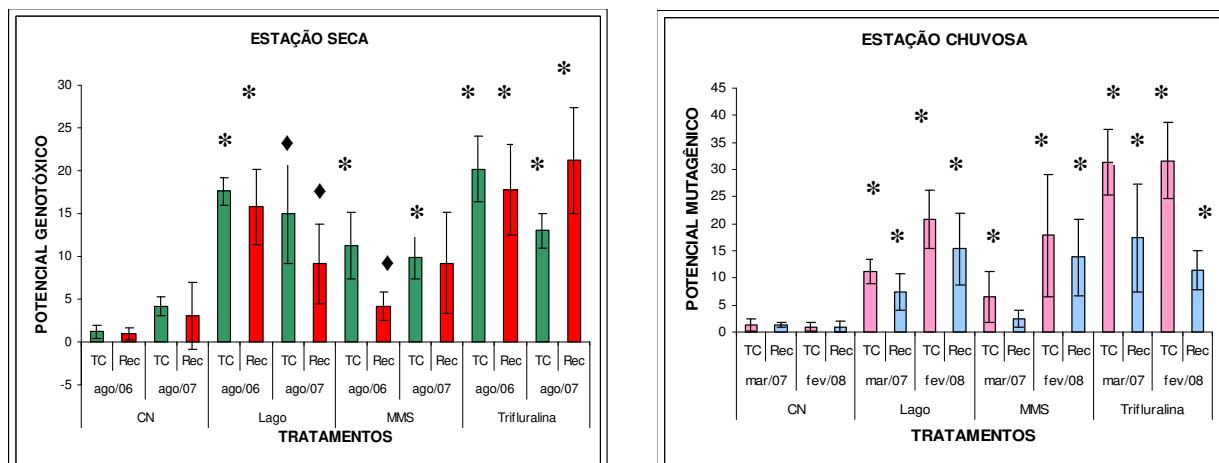


* valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Mann-Whitney, com $p < 0,01$.

♦ valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Figura 3. Alterações potencialmente mutagênicas (soma de micronúcleos e quebras cromossômicas) encontradas em células meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com água ultra pura, MMS, Trifluralina e águas oriundas de um ambiente lântico, para a estação seca e chuvosa.

Figura 4



* valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Mann-Whitney, com $p < 0,01$.

♦ valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Figura 4. Alterações potencialmente genotóxicas (soma das aberrações cromossômicas) encontradas em células meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com água ultra pura, MMS, Trifluralina e águas oriundas de um ambiente lântico, para a estação seca e chuvosa.

6. DISCUSSÃO GERAL

O lago analisado é diretamente influenciado pelas cargas pluviais e por despejos de origem doméstica, embora tal afirmação seja negada pelos órgãos municipais da cidade de Rio Claro-SP. Esta área pode ser tomada como um exemplo de degradação ambiental provocada por despejos de fontes antrópicas, principalmente, descargas de esgotos domésticos. De acordo com laudo of-098/CEI, da CETESB, de 29 de agosto de 2006, os parâmetros exigidos para que este lago se enquadre na classificação de águas do tipo 2, não são atendidos, uma vez que o número de bactérias termotolerantes está 48 mil vezes acima do permitido pela legislação.

Coletas de águas sazonais foram realizadas nos meses de agosto/2006 e agosto/2007, representando a estação seca, e março/2007 e fevereiro/2008, representando a estação chuvosa. As duas estações são bem caracterizadas na cidade de Rio Claro-SP pelos meses de coletas, como demonstrado pelos dados meteorológicos. Portanto, as coletas foram realizadas nestes períodos, com o intuito de avaliar a influência da sazonalidade na dinâmica do lago.

As análises físico-químicas, realizadas nos meses de agosto/2007 e fevereiro/2008 detectaram a presença de metais. Os metais que possuem concentrações acima da permitida pela legislação vigente (CONAMA 357/2005) são: Al, Ag, Cd, Cu, Fe e Hg, detectados na coleta de agosto/2007 e Ag, Cd, Cu e Fe, em fevereiro/2008. De acordo com a literatura, esses metais podem ser encontrados em despejos domésticos. Assim, somadas as informações constantes no laudo da CETESB (2006), que indica a presença de bactérias termotolerantes com as análises físico-químicas aqui apresentadas, referentes aos metais, é possível afirmar que o maior problema do lago é o despejo de esgotos clandestinos e, possivelmente, o efeito acumulativo dos contaminantes presentes nos sedimentos.

Um dos maiores agravantes da presença de tais metais neste lago é o fato de que eles podem se acumular no tecido muscular dos peixes. O consumo desses peixes pela população é preocupante, uma vez que certos metais são carcinogênicos e estão relacionados a algumas doenças, como o mal de Alzheimer. Portanto, é extremamente importante ressaltar a proibição da pesca neste lago e conscientizar a população sobre o prejuízo do consumo dos peixes ali obtidos.

Uma vez que o vegetal superior *A. cepa* e o teleósteo *O. niloticus* representam excelentes organismos para o monitoramento de ambientes aquáticos (GROVER; KAUR,

1999; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; GRISOLIA et al., 2005), este foram aplicados no presente estudo para a avaliação das águas deste lago, tido por ambiente lântico, para verificação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico.

Foram realizados o teste do micronúcleo e de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*; este foi utilizado para avaliar as variações no ciclo celular, decorrentes da ação de agentes tóxicos presentes nas amostras de águas, em dois diferentes tratamentos: tratamento contínuo e o período de recuperação.

Os bioensaios com *O. niloticus* também foram realizados com as amostras de águas do lago, para avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, por meio da análise de eritrócitos em processo de morte celular e portadores de alterações na morfologia nuclear e micronúcleos, utilizando o teste do micronúcleo. O ensaio do cometa também foi aplicado em *O. niloticus*, para avaliar o potencial genotóxico dessas águas.

Após a realização e análise dos resultados obtidos pelos bioensaios, foi possível detectar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do lago.

A citotoxicidade foi caracterizada pela presença de células em processo de morte celular, para ambos os organismos-teste empregados, nas coletas de março/2007, no tratamento contínuo, no sistema-teste de *A. cepa* e, nas coletas de março e agosto/2007 e fevereiro/2008, em *O. niloticus*. Segundo Duke et al. (1996) um importante papel da morte celular, independente de ser necrótica ou apoptótica, induzida por agentes químicos, físicos ou biológicos é a eliminação de células que se tornaram malignas ou que iriam influenciar, negativamente, na manutenção do metabolismo normal do indivíduo.

No sistema-teste de *A. cepa*, os valores obtidos para o índice mitótico também podem ser considerados para a avaliação deste parâmetro. No entanto, por meio da avaliação do índice mitótico, foi possível detectar a citotoxicidade em ambas as estações, no tratamento contínuo e no período de recuperação. Embora o potencial citotóxico seja caracterizado pela diminuição dos valores obtidos para o índice mitótico (SMAKA-KINCL et al., 1996), no presente estudo, a citotoxicidade foi evidenciada por um aumento, estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. De acordo com Matsumoto (2004), quando os índices mitóticos apresentam valores superiores aos encontrados no controle negativo, significa que houve uma indução no processo de divisão celular. Essa indução pode ocasionar uma proliferação descontrolada de células e acarretar em prejuízos para o organismo, com a formação de neoplasias.

Na estação seca (agosto/2007) e chuvosa (fevereiro/2008), houve uma redução dos valores obtidos para o índice mitótico, estatisticamente significativo, quando comparado ao

controle negativo, no período de recuperação. Essa redução pode ser decorrente da ação dos metais, que mesmo após o período de recuperação, demonstram a sua capacidade de inibir o processo de divisão celular das células de vegetais (FISKEJÖ, 1988).

Os dados aqui apresentados corroboram com as citações de Smaka-Kincl et al. (1996) e Matsumoto (2004), que afirmam que agentes contaminantes na água podem alterar, reduzindo ou aumentando, os índices mitóticos das células meristemáticas de *A. cepa*.

O período de recuperação em água ultra pura pode promover um restabelecimento dos valores obtidos para o índice mitótico, por auxiliar na recuperação da homeostase celular. Assim sendo, se houver uma recuperação da qualidade das águas do lago, pode haver uma minimização dos seus efeitos citotóxicos.

O potencial genotóxico e mutagênico das águas do lago estudado, coletadas no período de 2006 a 2008, foi avaliado pela frequência de células aberrantes em meristemas de *A. cepa* e, pela frequência de danos no DNA de *O. niloticus*, pela técnica de ensaio do cometa, micronúcleo e anormalidades nucleares.

Os danos induzidos por agentes genotóxicos são caracterizados por quebras simples e duplas da cadeia principal do material genético, aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos, além de outros erros nos processos de replicação do DNA e da expressão gênica (O'BRIEN et al., 2001 *apud* MATSUMOTO, 2004).

O potencial genotóxico e mutagênico foi evidenciado pela elevada frequência de aberrações cromossômicas e micronúcleos, nas células meristemáticas de *A. cepa*, no tratamento contínuo e no período de recuperação, em todas as coletas realizadas. Esses resultados confirmam que as águas do lago estudado apresentam um efeito genotóxico e mutagênico sobre as células de cebola.

As aberrações observadas e mais frequentes foram células portadoras de C-metáfases, aderência cromossômica, anáfases e telófases com pontes, perdas e atraso cromossômico e células portadoras de brotos nucleares. De acordo com estudos realizados por Fiskejö (1985), Voutsinas et al. (1997) e Seth et al. (2008), tais alterações podem ser decorrentes da ação de metais pesados, como o alumínio, o cádmio, o cobre e o mercúrio, que possuem uma ação aneugênica. Os resultados aqui apresentados sugerem que as substâncias presentes nas águas do lago também possuem a capacidade de interferir no fuso mitótico.

Células portadoras de micronúcleos em *A. cepa* foram estatisticamente significativas para todas as coletas realizadas, tanto no tratamento contínuo quanto no período de recuperação. Tais resultados sugerem que, os danos provocados durante o tratamento contínuo não foram restaurados, e persistiram após vários ciclos de divisão celular.

Logo, a existência de células micronucleadas indicam que as águas do lago apresentam potencial mutagênico e que o período de recuperação em água ultra pura não foi eficiente para minimizar os efeitos genotóxicos e mutagênicos dessas águas, sobre o material genético de *A. cepa*.

Para o organismo-teste de *O. niloticus*, o potencial genotóxico foi evidenciado pelo teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares e pelo ensaio do cometa. Nossos dados revelam que todas as coletas apresentaram efeitos genotóxicos e mutagênicos. A maior frequência de micronúcleos foi observada na estação chuvosa, embora um número estatisticamente significativo também tenha sido detectado na estação seca.

As outras anormalidades nucleares, descritas por Carrasco et al. (1990), como núcleos do tipo “blebbed”, “lobed”, “notched” e “broken-egg” foram as mais observadas no presente estudo, pelo teste do micronúcleo associado à análise de tais anormalidades. De acordo com Çavas e Gözükar (2003), essas anormalidades podem ser consideradas como danos genotóxicos. A alteração mais observada para ambas as estações de coleta foi núcleos do tipo “notched”. De acordo com Ghandially (1995), tal alteração pode ser decorrente de uma aneuploidia. Sugerimos que tal efeito seja resultado da ação aneugênica dos metais encontrados em valores acima do permitido pela legislação; estes dados corroboram os observados por Al-Sabti e Metcalfe (1995) e Ghandially (1995). Os dados obtidos com *A. cepa* também corroboram com esta afirmação, pois na comparação do tamanho dos micronúcleos, observou-se que os mesmos eram derivados de uma ação aneugênica, pois apresentavam grande tamanho.

O ensaio do cometa evidencia danos causados à molécula de DNA, constituindo uma eficiente ferramenta para o biomonitoramento ambiental (MONTEITH; VANSTONE, 1995). Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa, aplicado em eritrócitos de peixes revelam que o efeito genotóxico foi significativo para as duas estações, embora na estação seca, observou-se um número maior de nucleóides pertencentes às classes 1 e 3. Para a estação chuvosa, uma elevada frequência de nucleóides pertencentes à classe 2, foi estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

Pelos resultados apresentados neste estudo, para os dois sistemas-testes empregados, é possível afirmar que a sazonalidade, provavelmente, influenciou nos dados obtidos, uma vez que na estação chuvosa, possivelmente, houve um maior carreamento de substâncias citotóxicas pelas águas das chuvas, que acabaram induzindo a morte celular das células de cebola e de tilápias. Tais resultados também podem ser decorrentes de uma maior fuidez das membranas das células desses organismos, em decorrência do aumento da temperatura

na estação chuvosa.

Embora não tenhamos obtidos dados nas análises físico-químicas, a respeito de contaminação por elementos derivados de combustíveis fósseis, como os HPAs, em conversas pessoais com o administrador do lago, descobrimos que na estação chuvosa, muitas vezes, era possível observar uma película de óleo sob a superfície do lago. Segundo o administrador, essa película era oriunda da lavagem dos pátios dos postos de gasolina, próximos ao lago. De acordo com as pessoas que praticavam a atividade pesqueira, os peixes ali obtidos possuíam um forte cheiro de gasolina.

Logo, acreditamos que na estação chuvosa, não só os metais são carregados pelas águas das chuvas, como também outras substâncias, como as derivadas de postos de gasolina. Nesta estação, embora haja um carregamento de substâncias, é possível também que ocorra uma diluição dos metais ali presentes, demonstrado pela baixa incidência de Al e Hg.

Em contrapartida, na estação seca, como na maioria dos reservatórios de águas do estado de São Paulo, o lago perde volume de suas águas, o que acarreta em uma maior concentração dos poluentes, devido à escassez de chuvas. Nesta estação, há também uma maior interação dos elementos presentes no sedimento depositado com a coluna d'água, o que também explica a presença, em elevadas concentrações, dos metais alumínio e mercúrio, nesta estação do ano.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que:

- Ambientes lênticos impactados por águas pluviais e por despejo de origem doméstica podem apresentar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos aos organismos expostos, conforme observado no lago em questão, pela avaliação de suas águas, por meio dos sistemas-teste de *A. cepa* e *O. niloticus*.
- Tais potenciais foram evidenciados em todas as coletas realizadas, representando perigo, nas diferentes estações analisadas neste estudo;
- As análises físico-químicas, principalmente a de detecção de metais, foram importantes para uma melhor compreensão das reações dos organismos-teste às amostras de águas do lago;
- A sazonalidade e a dinâmica do lago influenciaram nos resultados obtidos, uma vez que na estação chuvosa, possivelmente, houve um maior carreamento de substâncias citotóxicas pelas águas das chuvas. Em contrapartida, na estação seca, com a escassez de chuvas e, conseqüentemente, com a perda do volume de águas do lago, pode ter ocorrido uma maior concentração dos poluentes, inclusive de metais ou ainda, uma maior interação dos elementos presentes no sedimento com a coluna d'água, justificando a presença, em elevadas concentrações, dos metais alumínio e mercúrio, nesta estação do ano.
- Os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* mostraram-se eficientes para a avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das águas de um ambiente lêntico;
- O teste do micronúcleo associado às outras anormalidades nucleares e o ensaio do cometa, aplicados em eritrócitos de *O. niloticus* também mostraram-se eficientes para a avaliação dessas águas.
- Os dois organismos-teste utilizados no presente trabalho, bem como os testes empregados, se mostraram sensíveis e adequados para estudos de monitoramento ambiental.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.A.; NOVELLI, E.L.B.; DAL PAI SILVA, M.; ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Pollution**, Barking, v.114, p.169-175, 2001.

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

ALVES-COSTA, J. R. M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 2001. 125f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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**, Amsterdam, v.560, p.57-67, 2004.

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

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. 2008. 165f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

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 - Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v.415, p.167-184, 1998.

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

BRENDER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, Amsterdam, v.20, n.4, p.245-254, 2005.

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

BUTTOW, M.; STEIN, V.; HEIDEN, G.; ALT, C.C.; BOBROWSKI, V.L. Biomonitoramento das águas do lago do Ônibus/UFPel. Disponível em: <www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CB_01218.rtf>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2008.

CARDOSO; P.C.S.; LIMA, P.L.; BAHIA, M.O.; AMORIM, M.I.M.; BURBANO, R.R.; FARIAS, R.A.F. **Efeitos biológicos do mercúrio e seus derivados em seres humanos – uma revisão bibliográfica.** Belém: Universidade Federal do Pará. Disponível em: <http://www.facome.uqam.ca/pdf/cardoso_2002.PDF>. Acesso em: 18 de junho de 2008.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v.72, p.122-725, 2008.

CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L., MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v.47, p.2123-2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v.538, p.81-91, 2003.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**. Amsterdam, v.74, p.264-271, 2005.

CHAUHAN, L.K.S., SAVENA, P.M., GUPTA, S.K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.42, p.181-189, 1999.

CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; HUGHES, T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, Amsterdam, v.410, p.237-243, 1998.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio ambiente. Resolução 357/2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 19 de maio de 2008.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F.; FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v.426, p.167-171, 1999.

DAVID, J.A.O. **Estudo de *Mytella falcata* (Mollusca: Bivalvia) como indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de Santos-SP.** 2007. 199f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

De FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCI, P. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutation Research**, Amsterdam, v.258, p.285-320, 1991.

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

De FLORA, S; BENNICELLI, C e BAGNASCO, M - Genotoxicity of mercury compounds: A review. **Mutation Research**. Amsterdam, v.317, p.57-79, 1994.

DEPLEDGE, M.H. Genetic ecotoxicology: an overview. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v.200, p.57-66, 1996.

DI-PAOLO, C. **Aplicação do Ensaio Cometa ao estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona**. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2006.

DOVGALYUK, A.; KALYNYAK, T.; BLUME, Ya.B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristematic cells. **Cell Biology International**, London, v.27, p.193-195, 2003.

DUKE, R. C.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D. Apoptosis. **Scientific American**, New York, v.3, p.36-51, 1996.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, n.2, p.435-441, 2007.

ERDTMANN, B. Genética Toxicológica. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003, p.28-35.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELİK, A.; KOLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, New York, v.16, p.385-391, 2007.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2ª edição, 1998, 602p.

EVSEEVA, T.I.; GERAS'KIN, S.A.; SHUKTOMOVA, IL. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmetal Radioactivity**, Oxford, v.68, p.235-248, 2003.

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

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, Limerick, v.205, p.223-240, 2004.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.88, p.252-259, 2007.

FISKEJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, p.508-511, 1983.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v.102, p.99-112, 1985.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – An alternative in environmental studies – the relative toxicity of metal-ions. **Mutation Research**, Amsterdam, v.197, p.243-260, 1988.

FISKEJÖ, G. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v.8, p.291-298, 1993.

FRENZILI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour. **Mutation research**, Amsterdam, v.552, p.187-195, 2004.

GHANDIALLY, F.N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. **Butterworths**, London, 1982, 971 p.

GONTIJO, A.M.M.C.; BARRETO, R.E.; SPEIT, G.; Reyes, V.A.V.; VOLPATO, G.L.; SALVADORI, D.M.F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, Amsterdam, v.534, p.165-172, 2003.

GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v.281, p.89-92, 1982.

GRANT, W. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, n.2, p.175-85, 1994.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.1, p.235-239, 2000.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v.491, p.39-44, 2001.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, Amsterdam, v.518, p.145-150, 2002.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, A.B.B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.2, p.334-338, 2005.

GROSSEL, M.; DE BOECK, G.; JOHANNSSON, O.; WOOD, C.M. The effects of silver on intestinal ion and acid-base regulation in the marine teleost fish, *Parophrys vetulus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v.142, p.259-270, 1999.

GROSSEL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v.133, p.287-303, 2002.

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

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J., B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.94, n.1-2, p.1-32, 1990.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA – effects in single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, Germany, v.90, n.2-3, p.183-188, 1997.

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**, Amsterdam, v.399, n.2, p.125-133, 1998.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J.T.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v.123, p.61-118, 1983.

HENRIQUES, J.A.P.; LEITÃO, A.A.C. Artigo sobre a cooperação França-Brasil – Um pouco da história da mutagênese. Disponível em: <www.sbmcta.org.br>. Acesso em: 30 de janeiro de 2008.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIRINO, M.S. Histopathology biomarkers. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE Jr,P.M.; BERGAMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress**. Flórida: Lewis Publishers, p.155-209, 1992.

HOSE, J.R.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. **Marine Environmental Research**, Oxford, v.22, n.3, p.167-176, 1987.

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro, município de Rio Claro, pertencente à Bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. 52 f. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

HUBER, R.; STRENT, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, Amsterdam, v.111, p.185-193, 1983.

IBPS – Instituto Brasileiro de Produção Sustentável e Direito Ambiental. **Metais pesados contaminam Lagoa Rodrigo de Freitas**. Disponível em: <<http://www.ibps.com.br/index.asp?idnoticia=2593>>. Acesso em: 08 de agosto de 2006.

JUNDI, T.A.R.E.; FREITAS, T.R.O. Toxicologia Evolutiva. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003, p.101-113.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v.363, p.89-96, 1996.

KLIGERMAN, A.D.; BLOOM, S.E. A cytogenetics model for the study of chromosome aberrations in fishes. **Mutation Research**, Amsterdam, v.31, n.4, p.225-233, 1975.

KRISTEN, U. Use of higher plants as screens for toxicity assessment. **Toxicology in vitro**, United Kingdom, v.11, p.181-191, 1997.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water- A case study. **Mutation Research**, Amsterdam, v.650, p.80-86, 2008.

LEMOES, 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**, Amsterdam, v.19, p.197-201, 2005.

LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. **Nature**, v.156, p.751-752, 1945.

MA, T.-H.; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.334, p.185-195, 1995.

MA, C. Hg harm on cell membrane of rape leaf and cell endogenous protection effect. **Chinese Journal of Applied Ecology**, Shenyang, v.9, p.323-326, 1998.

MacGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. R. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. **Environmental Mutagenesis**, New York, v.2, n.4, p.509-514, 1980.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. **Environmental Research**, San Diego, Section A, v.88, p. 30-35, 2002.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; FÉRNANDEZ, Y.; MONTIEL, X.; TORREALBA, Z. Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and its correlation with toxicity. **Biocell**, Mendoza, v.30, p.259-267, 2006.

MARGALEF, R. Delimitación, volumen y configuración de las aguas epicontinentales. In: MARGALEF, R. **Limnología**. Barcelona: Ediciones Omega, 1983, p. 13-38.

MATSUMOTO, S.T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, Tokyo, v.69, n.4, p.399-408, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.1, p.148-158, 2006.

McCRARY, J.K.; CASTRO, M.; McKAYE, K. Mercury in fish from two Nicaraguan lakes: a recommendation for increased monitoring of fish for international commerce. **Environmental Pollution**, Barking, v.141, p.513-518, 2006.

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, Amsterdam, v.393, p.17-21, 1997.

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**, Amsterdam, 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**, Amsterdam, v.339, p.135-147, 1998.

MOITA, L.R. **O papel das lâminas d'água no espaço urbano: atração ou repulsão. O caso do Lago Azul de Rio Claro, SP.** 2007. 196 f. Dissertação (Mestrado em Geografia), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 2007.

MORAES, D. S. L. **Avaliação dos potenciais tóxico, citotóxico e genotóxico de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa*.** 2000. 158f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

MONTEITH, D.K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.345, n.3-4, p.97-103, 1995.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, Amsterdam, v.504, p.3-16, 2002.

OBE, M.G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHHANES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, Amsterdam, v.504, p.17-36, 2002.

OBERHOLSTER, P.J.; BOTHA, A.-M.; CLOETE, T.E. Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. **Environmental Pollution**, Barking, p.1-9, 2008. *In Press*.

ODUM, E.P. Breve descrição dos principais tipos de ecossistema natural na biosfera. **In:**

Ecologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.367-369, 1988.

OFFER, T.; BHAGAT, A.; LAL, A.; ATAMNA, W.; SINGER, S. T.; VICHINSKY, E. P.; KUYPERS, F. A.; AMES, B. N. Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1054, p.439-444, 2005.

OLIVELLA, M.A. Polycyclic aromatic carbons in rainwater and surface waters of Lake Maggiore, a subalpine lake in Northern Italy. **Chemosphere**, Oxford, v.63, p.116-131, 2006.

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

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

PANTALEÃO, S.M.; ALCÂNTARA, A.V.; ALVES, J.P.H.; SPANÓ, M.A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratinga River in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.47, p.219-224, 2006.

PATRA, J.; BAISAKHI, B.; MOHAPATRO, M.K.; PANDA, B.B. Aluminium triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and methyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in plant cells in vivo. **Mutation Research**, Amsterdam, v.465, p.1-9, 2000.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.52, p.199-223, 2004.

PEDRO, J. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e mutagênico do inseticida Fipronil (Regente), usando sistema teste de *Allium cepa***. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. **Série de Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador, v.4, 2001, 128p.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. Ecotoxicologia do ferro e seus compostos. **Série de Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador, v.4, 2001, 122 p.

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, London, v.32, p.554-556, 2008.

PEÑA, L.F. **Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para a monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios**. 1996. 199 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 1996.

POWERS, D.A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v.246, n.4928, p.352-358, 1989.

PROLO, P.; CHIAPPELLI, F.; GRASSO, E.; ROSSO, M.G.; NEAGOS, N.; DOVIO, A.; SARTORI, M.L.; PEROTTI, P.; FANTÒ, F.; CIVITA, M.; FIORUCCI, A.; VILLANUEVA, P.; ANGELI, A. Aluminium blunts the proliferative response and increases apoptosis of cultured human cells: putative relationship to alzheimer's disease. **Bioinformation**, v.2, n.1, p.24-27, 2007.

PURCELL, T.W.; PETERS, J.J. Sources of silver in the environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.17, p.539-546, 1998.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercambios entre cromátidas hermanas.** 1987. 276f. Tese (Doutorado) - Universidade de Complutense, Madrid, 1987.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Lund, v.18, p.49-53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, Amsterdam, v.312, p.17-24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v.390, p.121-127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.418, p.113-119, 1998.

RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M.H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lund, v.136, p.13-18, 2002.

RASHED, M.N.; Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, New York, v.27, p.27-33, 2001.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SAVLADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p.21-27.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; JORDÃO, B.Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.3, p.464-468, 2005.

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**, New York, v.43, p.301-304, 1998.

SCHIMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: **Principles and Methods for Their Detection** (Hollanender, A., ed.). Plenum Press, New York, v.4, p.31-53, 1976.

SETH, C.S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L.K.S.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, 2008. *In Press*

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v.368, p.171-179, 1996.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v.605, p.87-93, 2006.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás-PDPETRO, Campinas, p. 1-10, 2007.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F. GONÇALVES, R.A.; FONTANETTI, C.S. Avaliação da biorremediação e da biodegradação de hidrocarbonetos em solo contaminado, por meio do teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*. In: X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Bento Gonçalves-RS, 2008.

SOUZA, V.H.E.; SOARES, C.H.L.; CANTAGALLI, L.B.; VICENTINI, V.E.P. **Utilização de testes citogenéticos para avaliação de mutagênese ambiental**. Disponível em: <http://www.pec.uem.br/dcu/Trabalhos/6laudas/SOUZA,%20Vitor%20Hugo%20Enumo%20de.pdf>. Acesso em: 16 de junho de 2005.

STARLING, F. L. R. M. **Development of biomanipulation strategies for the remediation of eutrofication problems in an urban reservior, Lago Paranoá, Brazil**. 1998. PhD Thesis. University of Stirling, Scotland, 1998.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.31, p.183-191, 1998.

TANAKA, P.R. **O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro-SP)**. 2001. 40f. Monografia. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.19, n.1, p.103-110, 2003.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.35, p.206-221, 2000.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2003, p.327-344.

VEGA, M.M.; FERNANDEZ, T.B.; TARAZONA, J.V.; CASTAÑO, A. Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental pollution**, Barking, v.92, n.2, p.135-139, 1996.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistema-teste**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.90, n.1, p.42-51, 2008.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in Shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.43, p.284-291, 2002.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.199, p.2467-2475, 1996.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.605, p.78-86, 2006.

VOUTSINAS, G. ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell Biology International**, London, v.21, n.7, p.411-418, 1997.

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 383, p.232-236, 2007.