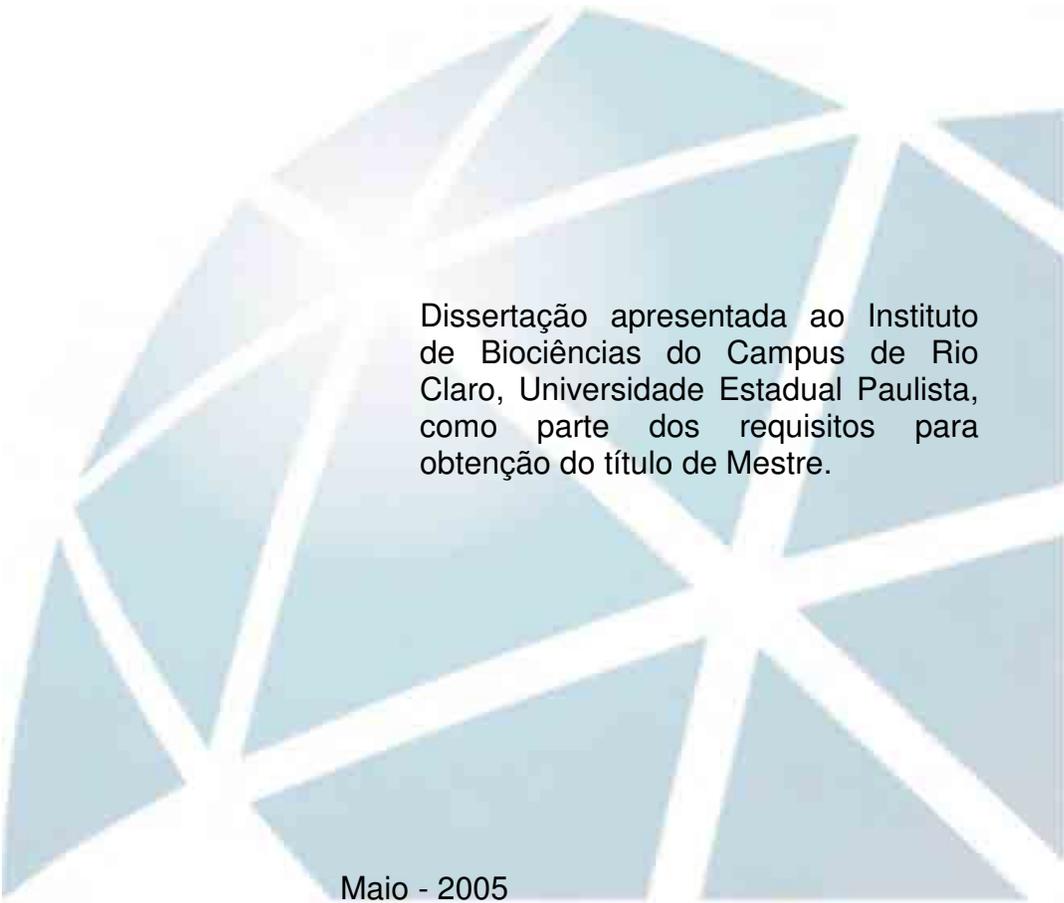

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E
MUTAGÊNICO DO RIO PARAÍBA DO SUL, NUMA
ÁREA SOB INFLUÊNCIA DE UMA REFINARIA DE
PETRÓLEO, UTILIZANDO *Oreochromis niloticus*
(PERCIFORMES, CICHLIDAE) COMO
ORGANISMO-TESTE**

TATIANA DA SILVA SOUZA



Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DO RIO
PARAÍBA DO SUL, NUMA ÁREA SOB INFLUÊNCIA DE UMA REFINARIA DE
PETRÓLEO, UTILIZANDO *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) COMO
ORGANISMO-TESTE**

TATIANA DA SILVA SOUZA

Orientadora: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus
de Rio Claro para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Área de
Concentração: Biologia Celular e Molecular)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Maio de 2005

"Talvez não tenhamos conseguido fazer
o melhor, mas lutamos para que o
melhor fosse feito.

(...) Não somos o que deveríamos ser, não somos o que
iremos ser, mas, graças a Deus não somos o que éramos".

(Martin Luther King)

“A parte verdadeiramente interessante da pesquisa é a que não se pode prever (...) Em pesquisa básica, se não há no início uma boa dose de incerteza sobre os resultados de um experimento, não há possibilidade de que se trate de um assunto interessante”
(François Jacob, 1998)

Aos meus pais, Dedico.

Agradecimentos

A realização desse trabalho só foi possível devido à ajuda de algumas pessoas e Instituições, as quais expresso meus agradecimentos:

À Profa. Dra. Carmem Fontanetti pela orientação, amizade e respeito.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales pelas valiosas sugestões e constante incentivo.

À Professora Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis por disponibilizar o Departamento de Bioquímica da UNESP de Rio Claro para armazenamento das amostras de água, para manutenção dos peixes e para a realização dos bioensaios. Agradeço-a também por todas as sugestões apresentadas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular por terem contribuído para minha formação.

Aos alunos, funcionários e professores do Departamento de Biologia, especialmente ao Fábio Brito, Vagner, Karina, Sandra, Neuza, Lucila, Cristiane, Profa. Dra. Sanae Kasahara e Profa. Dra. Doralice Maria Cella.

Ao Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo & Gás - PRH-ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista - UNESP-Rio Claro/SP pela concessão de bolsa e pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Dr. Dimas Dias Brito por estar sempre preocupado com a questão ambiental e com a formação e crescimento profissional de seus alunos.

Ao Zé Maria, por estar sempre pronto a ajudar, por resolver todos os problemas burocráticos relacionados à ANP, enfim, por ter feito tudo se tornar mais fácil.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UNESP pela concessão de auxílio financeiro para que eu pudesse freqüentar congressos e, assim, aprimorar minha formação.

À Profa. Dra. Eliana Gonçalves do Departamento de Zoologia da UNESP - Campus de São José do Rio Preto) pelo fornecimento do organismo-teste utilizado neste trabalho.

Ao Departamento de Controle do Espaço Aéreo - Serviço Regional de Proteção ao Vôo de São Paulo por ter cedido os dados climatológicos da Estação Meteorológica de Superfície de São José dos Campos.

À Cristiane Mileo, pela ajuda na montagem das fotos.

Aos técnicos de laboratório Rogilene, Anderson e Gerson pelo auxílio indispensável.

À todos os funcionários da UNESP de Rio Claro.

Ao Zito pelas dicas no tratamento e manutenção dos peixes no laboratório.

Ao Zito e Marcelo pelas coletas realizadas.

Ao grupo de Mutagênese da UNESP de Rio Claro.

À Sílvia Tamie e Kleber Agari pela amizade, conselhos e auxílio nas técnicas realizadas.

Ao Zé Augusto, Thaís e Márcia pela pronta ajuda em todas as etapas desse trabalho, pela amizade sincera, por dividirem comigo momentos de alegria e tristeza. Pela felicidade de saber que vocês existem e que estão sempre por perto. Pelo privilégio de poder compartilhar minha história com vocês.

Ao Salada por ser tão divertido, companheiro de baladas e viagens inesquecíveis.

Ao Du Murakami por ser uma das pessoas mais generosas e amigas que conheci. Por estar sempre disposto a ajudar. Por ser tão criativo e a pessoa ideal quando se precisa de uma opinião ou palpite, apesar dele “viajar na maionese” de vez em quando. Pelo carinho e lições de vida. Por ter sido minha fonte de inspiração...Por acima de tudo ser meu amigo!

Aos amigos Fred, Matheus, Bixão, Alexandra, Bellesa, Davi e Mari Machado por sempre estarem dispostos a fazer uma baladinha.

À Lilian simplesmente por ser a melhor amiga do mundo e à Paulinha por ser a amiga mais "fofa".

Ao Douglas por ser o amigo maravilhoso que é, “geniozinho”, prestativo e meio doido. Por ser uma pessoa que às vezes deixa a razão de lado e comete loucuras, sem medo de errar e da opinião alheia. Por lutar para conseguir o que deseja e por realizar seu trabalho com tanto amor e dedicação. Obrigada por ser meu espelho...

Ao Cacau e Boyê pela amizade e por todos os maravilhosos almoços oferecidos.

Ao Akio por todas as conversas, por ser uma pessoa única e autêntica, pela amizade e por sempre ter uma novidade pra contar.

Ao Newton, Vanes, Carlinha e Daiane, por ainda cultivarem a nossa amizade, mesmo à distância.

À todos os amigos e colegas de laboratório: Akio, Ana Paula, Angélica, Anita, Bombeiro, Bruna, Carol, Cauré, Dânia, Dani, Douglas, Du, Fred, Izabela, Jaqueline, Janaína, Jaú, Juliana, Kleber, Márcia, Marielle, Matheus, Pedro, Renata Caritá, Reinaldo, Rogi, Rosângela, Simone, Thaís, Vanessa, Zé e Zezão.

À Iracema e Leonardo por serem amigos fiéis e presentes.

À toda turma da Biologia Integral 99.

Ao Dudu pela companhia e paciência, pelo carinho e apoio, por me ensinar tantas coisas, pelas diferenças e loucuras. Por ser uma pessoa presente e um sopro de vida.

Às Republikanas: Bruna, Thalita, Vanes, Lucilene e Thaís por todos os momentos que passamos juntas; dando boas risadas, trabalhando, discutindo ou chorando...

Às colegas da atual República: Thaís, Juliana, Nayla e Ana por dividirem comigo o aluguel e as contas de água, luz e telefone.

À minha família: mãe, pai (*in memoriam*), vó, Karina e Priscila. Obrigada por terem incentivado e apoiado minha jornada. Agradeço por terem entendido minha ausência em muitos momentos. Dedico esse trabalho a vocês.

ÍNDICE

	Página
	01
1. RESUMO.....	
2. ABSTRACT.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	04
4. OBJETIVOS.....	06
 5. REVISÃO DE LITERATURA	
5.1. Genética Toxicológica e sua utilização nos estudos de biomonitoramento para avaliação da qualidade da água de rios.....	07
5.2. Ensaio do cometa.....	10
5.3. Teste do micronúcleo e teste do micronúcleo pisceo.....	12
5.4. Peixes como organismos-teste e considerações sobre Oreochromis niloticus.....	21
5.5. Características da área de estudo.....	23
5.6. Padrões de qualidade de água para a saúde pública, classificação das águas (segundo Resolução CONAMA 20/1986) e o rio Paraíba do Sul.....	24
5.7. Efluentes industriais e efluentes de indústria de petróleo.....	27
 6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 30
 7. RESULTADOS.....	 36
 Artigo 1. Aplicação do ensaio do cometa em eritrócitos de Oreochromis niloticus (Perciformes, Cichlidae) para avaliação do potencial genotóxico do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo.....	 37

Artigo 2. Indução de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> (Perciformes, Cichlidae), após exposição às águas do rio Paraíba do Sul, que recebe efluente de refinaria de petróleo.....	54
8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS.....	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1. RESUMO

O presente trabalho apresenta os resultados da avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul, através de testes de mutagenicidade e genotoxicidade. A área estudada sofre influência de uma refinaria de petróleo, localizada no município de São José dos Campos-SP. O ensaio do cometa e o teste do micronúcleo e de anormalidades nucleares foram aplicados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) expostos em laboratório, às amostras de água oriundas do rio. Essas amostras foram coletadas em três pontos distintos: montante do despejo do efluente (ponto 1), no local do despejo (ponto 2) e a jusante do mesmo (ponto 3). Água de poço artesiano foi utilizada como controle. As coletas ocorreram nos meses de maio e agosto de 2004 (estação seca) e em novembro de 2004 e janeiro de 2005 (estação chuvosa), totalizando 12 amostras. Foram montados bioensaios com 4 aquários contendo 5 espécimens de peixes cada um, os quais permaneceram por 72h nas amostras de água. As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca e os testes foram realizados. Para a avaliação dos resultados foi utilizado o teste estatístico do χ^2 . Através do teste do micronúcleo e de anormalidades nucleares foi possível detectar a presença de substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico e substâncias com potencial citotóxico, principalmente no local correspondente ao despejo do efluente da refinaria de petróleo. Entretanto, resultados significativos foram obtidos apenas em maio e agosto. Provavelmente, a menor incidência de chuvas nesse período do ano, provocou uma maior concentração de poluentes no rio Paraíba do Sul; enquanto isso, nos meses de novembro e janeiro de 2005, maiores índices pluviométricos possivelmente causaram a diluição dos poluentes presentes na água do rio. A partir do ensaio do cometa verificamos que em todos os meses de coleta, as frequências de nucleóides pertencentes às classes 2 e 3 foram significativas em relação ao controle para os pontos correspondentes ao local do despejo do efluente da refinaria e a jusante do mesmo. Apenas no mês de agosto, a frequência de cometas pertencentes à classe 1 também diferiu do controle na montante, indicando a possível presença de outra fonte de poluição neste local, além da refinaria de petróleo. Provavelmente, a detecção desses poluentes através da mensuração de quebras no DNA de *O. niloticus*, no mês de agosto também tenha sido decorrente de fatores sazonais. Diante do exposto, concluímos que as águas do rio Paraíba do Sul apresentam-se comprometidas na área influenciada pela

refinaria de petróleo. Concluimos também que o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo e de anormalidades nucleares poderiam ser rotineiramente requeridos pelos órgãos governamentais para detecção de agentes potencialmente poluidores, que são lançados no meio aquático.

2. ABSTRACT

The present work analyses the quality of Paraíba do Sul River using mutagenic and genotoxic tests. This area is under the influence of a petroleum refinery located in São José dos Campos, São Paulo, Brazil. The comet assay and the micronucleus test, associated to other nuclear abnormalities test, were performed on *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) erythrocytes. Water samples from Paraíba do Sul River were collected at three sites: 500m above the discharge of the treated petroleum refinery effluent in the river (site 1), in the local of the discharge (site 2) and 500m below the discharge (site 3). Samplings were carried out in May, August (dry season) and November 2004 and in January 2005 (rainy season). Bioassays with the water samples were assembled in the laboratory for 72 hours and five specimens were analyzed for each treatment. Simultaneously artesian well water was used as negative control. A total of 80 fishes were used for the experiments. Peripheral blood samples were obtained from cardiac puncture and the tests were realized. Qui-quadrado test was designed to verify the significance of the experiments. The micronucleus test and other nuclear abnormalities detected the presence of substances with cytotoxic and clastogenic and/or aneugenic potential, mainly at site 2. However, significant results were obtained only in May and August 2004. Probably, a deficit of rainwater caused the concentration of pollutants in Paraíba do Sul River in this period. In November 2004 and in January 2005 we observed a decreased of mutagenic activity, possibly the rainwater surplus caused the dilution of pollutants presents in the river. The comet assay showed statistically higher values for DNA migration in all months of the collects at sites 2 and 3. Only in August, DNA damage was detected in site 1; this fact indicates the possible presence of other source pollutants upstream and maybe the influence of seasonal factors. In conclusion the waters of Paraíba do Sul River are compromised at the petroleum refinery influence area; and genetic assays could be routinely applied to monitor the aquatic environment.

3. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional nos centros urbanos, acompanhado da falta de infraestrutura em alguns municípios, tem gerado sérias preocupações, principalmente, referentes ao destino final dos despejos domésticos e industriais (MORAES, 2000a).

O ambiente aquático tem sido, ao longo dos anos, um depósito de diferentes tipos de descargas antropogênicas. A água, por ser um solvente universal versátil, é constantemente utilizada para transportar produtos residuais para longe do local de produção e descarga. Infelizmente, a presença dos produtos residuais transportados pode degradar seriamente o ambiente do rio, lago ou riacho receptor (WHITE & RASMUSSEN, 1998).

Estudos recentes têm relatado a presença de substâncias tóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas em águas de rios, oriundas principalmente de atividades domésticas, industriais e agrícolas (LERDA & PROSPERI, 1995; WATANABE et al., 2002). Conseqüentemente, a poluição dos corpos d'água pode ser um sério problema para a saúde e bem estar da população que vive em torno dessas águas poluídas, bem como para a biota associada a esse ecossistema (OHE et al., 2003).

Com o intuito de minimizar o risco de poluição e evitar maiores problemas, a qualidade da água de rios tem sido assegurada através de programas de monitoramento ambiental. Devido à complexidade e variabilidade de compostos orgânicos e inorgânicos que podem estar presentes num mesmo efluente ou corpo hídrico, é recomendável que a caracterização dessas águas seja complementada com ensaios biológicos. Nesse sentido, associados ao controle e prevenção da poluição das águas, têm sido utilizados testes citogenéticos em diferentes organismos (ZAGATTO & GOLDSTEIN, 1991). Segundo Moraes (2000a), esses testes são indispensáveis para a avaliação de reações de organismos vivos frente à poluição ambiental complexa e para uma indicação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes.

Efluentes de refinarias de petróleo são diariamente lançados no meio aquático e podem conter substâncias potencialmente perigosas para os seres vivos, incluindo o ser humano. Embora raramente provoquem letalidade, respostas subletais em organismos expostos a esses efluentes, com implicações ecológicas ainda desconhecidas, têm sido reportadas em bactérias, invertebrados, plantas e peixes (ROWE et al., 1983 a, b; WESTLAKE, et al., 1983 a, b, c; CHAPMAN et al., 1994; SHERRY et al., 1994, 1997).

Neste contexto, a partir da coleta sazonal de água de três pontos do rio Paraíba do Sul, o presente trabalho visou avaliar os possíveis danos que suas águas, numa área sob influência do despejo do efluente de uma refinaria de petróleo, localizada em São José dos Campos – SP, poderiam causar ao material genético de peixes pertencentes à espécie *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), através do teste do micronúcleo associado com anormalidades nucleares e por meio do ensaio do cometa.

4. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principais objetivos:

- Avaliar o potencial genotóxico, através do teste do cometa, das águas do rio Paraíba do Sul, município de São José dos Campos, após o recebimento de efluente de refinaria de petróleo;
- Avaliar o potencial mutagênico, através do teste do micronúcleo e de outras anormalidades nucleares, das águas do rio Paraíba do Sul, município de São José dos Campos, após o recebimento de efluente de refinaria de petróleo;
- Identificar e determinar as frequências dos principais tipos de alterações nucleares encontradas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição às águas do rio Paraíba do Sul;
- Avaliar a influência da sazonalidade sobre os resultados das avaliações genotóxica e mutagênica;

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1. Genética Toxicológica e sua utilização no biomonitoramento do meio aquático

Num esforço para proteção do ambiente aquático, agências governamentais, em diversos países, têm adotado legislação que visa reduzir ou mesmo eliminar descargas industriais tóxicas (WHITE, et al., 1996).

As metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para atender os usos múltiplos da água. Isso pode ser atingido através de uma análise integrada da qualidade da água, ou seja, considerando não apenas as metodologias tradicionais de avaliação, mas aspectos biológicos do sistema (ROSENBERG & RESH, 1993).

A proteção dos ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando categorizar a influência antrópica sobre os sistemas biológicos (CAIRNS et al., 1993). Neste contexto, a definição de biomonitoramento mais aceita é o uso sistemático das respostas de organismos vivos, seja ele como um todo ou, através de um determinado tecido, para avaliar mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações humanas (MATTHEWS et al., 1982; SILVA et al., 2003). Os programas de biomonitoramento são, em geral, utilizados na detecção do problema e posterior controle do mesmo.

Segundo Metcalfe (1989), a utilização de respostas biológicas como indicadoras de degradação ambiental é vantajoso em relação às medidas físicas e químicas da água, pois estas registram apenas o momento em que foram coletadas, necessitando assim de um grande número de análises para a realização de um monitoramento temporal eficiente. Outra desvantagem é que, se forem realizadas longe da fonte poluente, as medições químicas não serão capazes de detectar perturbações sutis sobre o ecossistema (PRATT & COLER, 1976).

Critérios biológicos são, conforme Karr (1981), valiosos na investigação de alterações dos recursos hídricos porque medem diretamente a condição de risco do recurso, detectam problemas que outros métodos podem subestimar ou não diagnosticar e fornecem um processo sistemático para a avaliação progressiva resultante da implementação de programas de qualidade de água. Segundo o autor, os critérios

biológicos não substituem métodos químicos e físicos, mas aumentam a probabilidade de um programa de avaliação, detectar degradação devido influências antropogênicas.

Neste contexto, diversos testes citogenéticos de curta duração têm sido utilizados para a avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de rios que recebem algum tipo de descarga possivelmente poluidora.

Segundo Pilot & Dragan (1996) e Mídio & Martins (2000), agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico.

Houk (1992) comenta a existência de três classes de mutações:

- Mutação gênica: referente a mutações no gene (ou de ponto), que causam alterações na seqüência de DNA dentro do gene;
- Mutação cromossômica estrutural: referente a alterações na estrutura cromossômica, usualmente resultando em ganho ou perda, ou rearranjo de peças cromossômicas (deleções, translocações);
- Mutação cromossômica numérica (aneuploidia e poliploidia): referente a ganho ou perda de cromossomos intactos.

Embora ocorram mutações espontâneas, a maioria delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem pode ser exposto (MATSUMOTO, 2004). Desta maneira, a detecção e o entendimento das propriedades desses agentes permitem avaliar os efeitos hereditários deletérios, ou mesmo letais, para os organismos (ARNAIZ, 1995).

Houk (1992) descreveu a importância dos testes genotóxicos e mutagênicos nos estudos de monitoramento ambiental e para a saúde humana. Estes, utilizam diversos organismos, como por exemplo, microrganismos, insetos, plantas e animais. Os testes podem ser divididos em grupos, com base no sistema biológico empregado e na localização genética detectada. Bioensaios em procariotos detectam agentes que induzem mutações gênicas e danos primários no DNA. Incluída nesta categoria está a análise de mutagenicidade em *Salmonella*, ou teste de Ames. Análises em eucariotos detectam uma amplitude maior de danos, incluindo mutações gênicas, danos e reparo do DNA, danos cromossômicos e aneuploidias.

Em 1983, Athanasiou & Kyrtopoulos determinaram o potencial mutagênico de produtos organoclorados em águas de um rio de Atenas, utilizando o sistema da reversão de his+ em *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) e trocas entre cromátides irmãs e aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês (CHO). Monarca et al. (1985) e Filipic (1995) também encontraram resultados positivos quanto à formação de substâncias mutagênicas em água de consumo, utilizando o teste de Ames.

Umbuzeiro et al. (2004) aplicaram o teste de Ames em amostras de água e sedimento do Ribeirão dos Cristais-SP. Os autores também aplicaram o teste diretamente no efluente de duas indústrias localizadas nas proximidades do rio. Concluíram que o teste de Ames foi bastante útil para a identificação das fontes de poluição e identificação das classes de compostos químicos responsáveis pela atividade mutagênica encontrada no rio analisado.

Segundo Rabello-Gay et al. (1991), embora os testes de mutagenicidade em muitos microrganismos apresentem boa correlação com seu potencial carcinogênico em animais superiores e ofereçam vantagens quanto ao custo e rapidez, essa associação falha em certos casos. Há várias explicações para esses resultados negativos, tais como a simplicidade da estrutura e da capacidade metabólica do sistema. Assim, em geral, são mais relevantes os ensaios feitos *in vitro* e *in vivo*, utilizando plantas, invertebrados e vertebrados.

Dentre os testes realizados com eucariotos, destacam-se o teste de aberrações cromossômicas, quantificação de adutos de DNA, troca entre cromátides irmãs, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo.

Bombail et al. (2001) aplicaram o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes (*Pholis gunnellus*) coletados em áreas contaminadas e não contaminadas de uma região estuarina da Inglaterra. Esta região sofre influência de indústrias petroquímicas desde 1924, bem como de numerosas indústrias que despejam na água efluentes contendo metais, hidrocarbonetos e organoclorados (ELLIOTT & GRIFFITHS, 1987).

Resultados significativos para essas técnicas predizem instabilidade genética, que pode representar os passos iniciais para o processo carcinogênico (PILOT & DRAGAN, 1996; MÍDIO & MARTINS, 2000; FENECH, 2002; RIBEIRO, 2003;

RIBEIRO & MARQUES, 2003). Além disso, os testes citogenéticos constituem uma ferramenta importante para a avaliação da qualidade do meio aquático.

5.2. Ensaio do cometa

Nas duas últimas décadas, novas metodologias para avaliação de danos no DNA têm sido desenvolvidas. Uma das técnicas mais utilizadas para detecção de genotoxicidade tem sido o ensaio do cometa. Esta técnica não é utilizada para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas com o teste do cometa são passíveis de correção (GONTIJO & TICE, 2003), constituindo, portanto, lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001). Por ser considerado sensível, rápido e econômico (MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998; SASAKI et al., 1997; KOSZVNENCHAK & ROKOSZ, 1997), o ensaio do cometa tem sido indicado como um método capaz de detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA (KOPPEN et al., 1999).

Östling & Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver uma técnica de eletroforese em gel para detectar danos no DNA em células únicas. Esta técnica levou em consideração o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização dentro do núcleo. Sabe-se que para ser compactado, após o seu enovelamento com proteínas histônicas, o DNA forma alças de 5-200 Kpb, as quais são aderidas a uma rede protéica (matriz nuclear). Deste modo, células embebidas em agarose foram colocadas em uma lâmina de microscopia, tiveram suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) foram extraídas com altas concentrações de sais. O DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupou o espaço do gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, designada nucleóide (COOK & BRAZELL, 1976). Dentre as poucas proteínas que resistiram a essa extração estão as proteínas da matriz nuclear (OLIVE & BANÁTH, 1995).

Por definição, o nucleóide é uma série de alças superenoveladas de DNA, desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula. Caso existam quebras na molécula de DNA a estrutura do nucleóide sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo (COOK & BRAZELL, 1976, 1978; VOGELSTEIN et al., 1980).

As lâminas foram submetidas à eletroforese sob condições neutras. As células com alta frequência de quebras no DNA mostraram uma migração crescente de DNA em direção ao ânodo, devido sua carga negativa, dando a aparência da cauda de um cometa. As células sem, ou com pouco, dano no material genético não apresentaram cauda. A migração de DNA foi quantificada por coloração fluorescente específico para DNA. As condições neutras utilizadas permitiam a detecção de quebras de fita dupla e ligações cruzadas (ÖSTLING & JOHANSON, 1984).

Mais tarde, Singh et al. (1988), desenvolveram o ensaio do cometa ou SCGE – Single-Cell Gel Electrophoresis, sob condições alcalinas (pH > 13), aumentando a eficiência da técnica. Sob essas condições, o ensaio do cometa permite a detecção de quebras de fita simples, quebras de dupla-fita, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos, excisão de sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas (ROJAS et al., 1999; TICE et al. 2000). Esse aumento de sensibilidade do ensaio foi atribuído ao fato da dupla fita de DNA, uma vez exposta a pH extremamente alcalino, sofrer desnaturação, isto é, separar-se em fitas simples de DNA (GONTIJO & TICE, 2003).

Os protocolos para o ensaio do cometa variam entre laboratórios, porém recentemente, Mcnamee et al. (2000) propuseram modificações nos métodos ortodoxos de célula única, fazendo com que várias células fossem processadas de uma só vez, aumentando a eficiência da técnica, sem comprometer a sua confiabilidade. Os resultados obtidos por eles mostraram-se similares àqueles previamente reportados quando o ensaio do cometa convencional foi utilizado.

O ensaio do cometa tem sido descrito como vantajoso por vários fatores: a avaliação do dano é realizada em células individuais, um pequeno número de células é requerido para a realização do teste, toda célula eucariótica poder ser utilizada e pelo fato do teste detectar lesões no DNA em células viáveis, mesmo que não estejam em proliferação (ROJAS et al., 1999).

Monteith & Vanstone (1995) compararam o potencial do ensaio do cometa como teste genotóxico, com outras técnicas *in vitro* (aberrações cromossômicas e mutações, utilizando células pulmonares V79 de hamsteres chineses) e *in vivo* (micronúcleos de medula óssea em camundongos e reparo de DNA em ratos), demonstrando que o cometa tem a habilidade de detectar danos no DNA, tanto quanto as demais técnicas.

Durante a última década, o ensaio do cometa foi extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, incluindo biomonitoramento

ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética (GONTIJO & TICE, 2003).

Dentre as inúmeras aplicações do ensaio do cometa, a eficiência da técnica para a detecção do potencial genotóxico de contaminantes aquáticos tem sido descrita por muitos autores (KOSZ-VNENCHAK & ROKOSZ, 1997; SASAKI et al., 1997; AVISHAI et al., 2002, MATSUMOTO et al., 2004). O potencial de aplicação do ensaio do cometa para biomonitoramento ambiental é quase ilimitado, com vários organismos aquáticos sendo utilizados para este fim (ROJAS et al., 1999; TICE, et al., 1995, HAMOUTENE, et al., 2002; KLOBUCAR, et al., 2003). Porém, Gontijo & Tice (2003) advertiram que este teste é essencialmente um ensaio comparativo, de forma que são de extrema importância os controles experimentais. Ainda ressaltaram que se deve ter em mente que não existem células sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno 1000 lesões diárias no DNA/célula.

O ensaio do cometa tem sido aplicado com sucesso em eritrócitos de várias espécies de peixes, sendo destacada a sensibilidade das células sangüíneas destes animais aos efeitos genotóxicos (MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998; NACCI et al., 1996; BELPAEME et al., 1996). Em peixes, a técnica também tem sido aplicada em outros tipos celulares, tais como hepatócitos, células da brânquia, células renais e células intestinais (NACCI et al., 1996; BELPAEME et al., 1998; ABD-ALLAH et al., 1999).

Esta técnica tem sido uma ferramenta bastante útil na avaliação do potencial genotóxico de áreas impactadas com petróleo e seus derivados. Hamoutene et al. (2002) e Taban et al. (2004) aplicaram a técnica em invertebrados, expostos a águas contaminadas com uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Os resultados obtidos demonstraram que baixos níveis de hidrocarbonetos foram capazes de gerar lesões no DNA dos organismos testados.

5.3. Teste do micronúcleo e teste do micronúcleos pisceio

O teste do micronúcleo é um teste mutagênico, que tem sido aplicado com sucesso na detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e na detecção de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR et al., 1987; HAYASHI et al., 1994).

Os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos, não reparados ou reparados erroneamente, induzidos nas células parentais (RIBEIRO, 2003). Apresentam estrutura similar ao núcleo principal, tendo também o seu DNA recoberto pelo envoltório nuclear (WALKER et al., 1996). Sua origem se dá durante a divisão celular, devido a quebra cromossômica ou atraso cromossômico na anáfase (FRIEAUFF et al., 1998).

No primeiro caso, os fragmentos cromossômicos, resultantes de quebras, podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Um envoltório nuclear se forma em torno do fragmento, o qual é visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO, 2003). Danos cromossômicos estruturais estão relacionados com exposição direta do agente mutagênico com o DNA e/ou com defeitos intracelulares na replicação do DNA, recombinação ou mecanismo de reparo (FENECH, 2000; SAUNDERS et al., 2000).

No segundo caso, os micronúcleos são formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre falha na segregação cromossômica durante a divisão celular (FENECH, 2000). Compostos químicos que induzem aneuploidia são chamados aneugênicos e caracterizam-se pela interação com mais de um alvo (CREBELLI & CARERE, 1993), tais como moléculas envolvidas na união e separação das cromátides (condensação cromossômica, crossing-over, cinetócoro, proteínas de ligação cromatídicas), moléculas que são parte essenciais de estruturas contidas no DNA (centrômeros e telômeros), moléculas envolvidas no controle do ciclo celular (ciclina, cdk, p53) e APC (complexos promotores da anáfase), moléculas que fazem parte do aparato mitótico (tubulina, centríolos) e moléculas envolvidas indiretamente no controle do ciclo celular (calmodulina e as moléculas da membrana celular ou nuclear) (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

Uma alteração mitótica extremamente rara em células normais, porém descrita em células cancerosas de mamíferos, refletindo provavelmente anoxia e degeneração tecidual, é a mitose C, assim denominada devido à ação da droga colchicina. Os cromossomos comportam-se normalmente durante toda a prófase até a metáfase, porém, ou o fuso celular mostra-se defeituoso ou está ausente, de modo que os cromossomos não se reúnem na placa metafásica. Conseqüentemente, os cromossomos se dispersam na célula, se dividem e posteriormente se reúnem em um núcleo de constituição tetraplóide

ou formam micronúcleos de tamanhos variados (THERMAN & SUSMAN, 1996; KIRSCH-VOLDERS et al. 2002).

Micronúcleos também podem ter origem durante a meiose, como conseqüência de aberrações cromossômicas. Além disso, deve ser considerado o efeito do quiasma durante o qual ocorre uma inversão paracêntrica que pode gerar além de um cromossomo dicêntrico, um fragmento acêntrico, que por sua vez, poderá formar um micronúcleo (HEDDLE et al., 1991).

A utilização de técnicas moleculares, como sondas específicas para a região centromérica do cromossomo ou anticorpos anticinetócoro, permite distinguir micronúcleos originados de fragmentos acêntricos de micronúcleos formados a partir de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal da célula (RIBEIRO, 2003). Além disso, o teste do micronúcleo combinado com a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é bastante confiável para os estudos de indução de aneuploidia: perda cromossômica e não disjunção cromossômica (KIRSCH-VOLDERS et al., 1997). Deste modo, a detecção dos sinais de FISH para uma seqüência cromossômica específica no macronúcleo e no micronúcleo indica perda cromossômica, enquanto que a presença de sinais adicionais de FISH no macronúcleo é indicativo de não-disjunção cromossômica (KIRSCH-VOLDERS et al., 1996).

Durante a análise de micronúcleos, alguns pesquisadores têm observado a existência de outras anormalidades nucleares, sugerindo que estas devem ser contadas concomitantemente à análise convencional de micronúcleos (SCHOROEDER, 1970; TOLBERT et al., 1991, 1992, FENECH et al., 1999). Essas anomalias estão relacionadas aos erros que ocorrem durante a divisão celular, com os processos de morte celular - necrose e apoptose, e com genotoxicidade e/ou mutagenicidade (NAKANO & OKA, 1991; CORMAK, 1991; TOLBERT et al., 1992; FENECH, 2000).

Além de células apoptóticas e necróticas, Fenech et al. (1999) e Fenech (2000) recomendaram, nos testes *in vitro*, a contagem de células com pontes nucleoplasmáticas e de brotos nucleares, juntamente com o micronúcleo. As pontes expressam-se como ligações contínuas entre os núcleos das células binucleadas e parecem ser o resultado de rearranjos cromossômicos envolvendo mais de um centrômero (cromossomos dicêntricos) ou de cromátides que migram para pólos opostos da célula durante a anáfase. Segundo Serrano-Garcia & Montero-Montaya (2001) e Kirsch-Volders et al. (2002), os brotos nucleares, assim como os *broken-eggs* constituem um dos passos para a expulsão

do micronúcleo do núcleo principal da célula. De acordo com Tolbert et al. (1992), os *broken-eggs* foram descrito por Sarto (1988) e correspondem a estruturas semelhantes ao micronúcleo, mas que permanecem conectados ao núcleo principal por uma haste Feulgen-positiva.

Vários autores têm discutido o significado da formação do micronúcleo para a célula e o destino do mesmo depois de sua formação. Altas frequências de micronúcleos têm sido correlacionadas com o desenvolvimento de câncer. A inclusão de um gene supressor de tumor no micronúcleo e a subsequente perda do mesmo somados com um acúmulo de mutações poderia gerar neoplasia e, portanto ser um passo para a carcinogênese (CAI, 1988, BENNER et al., 1993; STOPPER & MÜLLER, 1997). O micronúcleo, gerado a partir de um cromossomo interior, pode ainda ser reincorporado no núcleo principal da célula, se a síntese de DNA no micronúcleo for sincrônica com a síntese de DNA no núcleo principal. Se essa reintegração for bem sucedida, pode resultar numa célula normal, sem dano (GUSTAVINO et al., 1994; STOPPER & MÜLLER, 1997). Além disso, o micronúcleo pode ser retido dentro do citoplasma celular (LEACH & JACKSON-COOK, 2004) ou pode ser expulso da célula, constituindo um passo para a eliminação de material genético excedente, formando o microcito (STOPPER & MÜLLER, 1997; SHIMIZU et al., 1998).

Inicialmente, o teste do micronúcleo *in vivo*, em sistema teste animal, foi proposto independentemente por Schmid (1975) e Heddle (1973) em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongo. Mais tarde foi estendido a eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al., 1980). Consiste no teste de toxicidade genética mais utilizado para a avaliação do perigo de agentes químicos (RIBEIRO, 2003).

Os tecidos relacionados a hematopoese, em função da necessidade da reposição constante das células sangüíneas, apresentam elevada frequência de divisões celulares, portanto, as células oriundas deste tecido são mais indicadas para a observação de efeitos relacionados aos processos de divisão celular ou ao DNA (GRASSI, 2002). Deste modo são também indicadas para a aplicação do teste do micronúcleo *in vivo* (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

O teste *in vivo* pode ser aplicado em qualquer população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio de seu cariótipo, além de considerar o mecanismo de absorção, acumulação, eliminação e interações com compostos que podem levar a mecanismos sinérgicos ou antagônicos.

O teste do micronúcleo tem sido aplicado ainda em estudos de antimutagenicidade (RIBEIRO, 2003), na avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001), em estudos de biomonitoramento em humanos (BENNER et al., 1993; FENECH, 1993) e em estudos ecotoxicológicos (TOMA et al., 1994; MINISSI et al., 1996; GRISOLIA & STARLING, 2001), detectando e identificando agentes que alteram o DNA, presentes no ar, água e solo (GRISOLIA & CORDEIRO, 2000).

Atualmente uma grande variedade de organismos, como invertebrados aquáticos, anfíbios (BÉKAERT et al., 1999) e peixes (BAHARI et al., 1994; SANCHEZ-GALAN et al., 1999; AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ, 2000; BOMBAIL et al., 2001; ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; FERRARO et al., 2004) têm sido utilizados no teste do micronúcleo *in vivo*.

O teste do micronúcleo foi modificado por Hoofman & de Raat (1982) para aplicação em peixes. Esta modificação é comumente denominada teste do micronúcleo pisceo.

Várias espécies de peixes de água doce têm sido reportadas como bons bioindicadores para biomonitoramento de rios e lagos, utilizando o teste do micronúcleo como indicador de mutagenicidade.

Por apresentarem cromossomos pequenos, em grande quantidade, irregulares e com baixo índice mitótico, 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 (HOOFTMAN & VINK, 1981; KLIGERMAN, 1982; HAYASHI et al. 1998; AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ, 2000).

Assim como em roedores, eritrócitos são comumente utilizados no teste do micronúcleo pisceo. Os eritrócitos de peixes são ovais, de citoplasma acidófilo abundante, com núcleo central acompanhando o formato das células e cromatina densa, não sendo observados nucléolos (RANZANI-PAIVA, 1993).

Al-Sabti & Metcalfe (1995) afirmaram que eritrócitos de peixes são bastante adequados para este teste, especialmente porque micronúcleos podem ser contados facilmente neste tipo celular. Em peixes, o sangue periférico é de fácil obtenção, o que torna a técnica de micronúcleo bastante simples e rápida (GRASSI, 2002). Vários estudos têm demonstrado que eritrócitos periféricos de peixes apresentam um alto índice de

micronúcleos após exposição a diferentes poluentes sobre condições de campo ou de laboratório (HOOFTMAN & de RAAT, 1982; HOSE et al., 1983; UEDA et al., 1992; ANITHA et al., 2000; BOMBAIL et al., 2001; ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

Brunetti et al. (1988) utilizaram o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes para monitorarem um ambiente marinho quanto à presença de substâncias mutagênicas.

Al-Sabti et al. (1994) investigaram os efeitos mutagênicos causados pelo Cromo (tri e hexavalente) em carpas da Prússia (*Carassius auratus gibelio*), empregando o teste do micronúcleo. Os autores observaram que, em laboratório e no campo, a exposição dos animais a vários níveis de concentração deste metal pesado causou um aumento na frequência de micronúcleos, comparado ao grupo controle.

O teste do micronúcleo foi aplicado por Minissi et al. (1996) para a detecção de mutágenos em dois rios localizados na Itália, um poluído (rio Tiber) e outro não poluído (rio Mignone). A presença de agentes mutagênicos no rio Tiber foi evidenciada pela alta frequência de micronúcleos encontrada nos eritrócitos de *Barbus plebejus*. Por outro lado, a frequência de micronúcleos observada no rio Mignone foi extremamente baixa.

Devaux et al. (1998) demonstraram que os níveis de dano no DNA foram maiores em eritrócitos de *Leuciscus cephalus* coletados em águas poluídas do rio Rhône (França), comparados com os peixes coletados em áreas de referência.

Em 2001, Grisolia & Starling utilizaram o teste do micronúcleo em eritrócitos de tilápia, para monitorar o Lago Paranoá (Brasil), após descarga de esgoto doméstico.

Grassi (2002), analisando eritrócitos de diversas espécies de peixes da Bacia do rio Piracicaba (SP), identificou a ocorrência de micronúcleos como danos genéticos decorrentes das condições ambientais. Do total de animais amostrados (116) foi constatada a formação de micronúcleos em 82%.

Diversos estudos concluíram que a indução de micronúcleos em eritrócitos periféricos de peixes depende do tempo de exposição dos mesmos às substâncias testadas. Manna et al. (1985) e Das & Nanda (1986) reportaram um aumento dose-dependente e tempo-dependente da indução de micronúcleos em *Oreochromis mossambicus* e em *Heteropneustes fossilis*.

Uma alternativa possível à utilização de eritrócitos do sangue periférico, tem sido utilizar células do rim (responsável pela metabolização de xenobióticos), brânquias e fígado (AL-SABTI & METCALFE, 1995). Em 1986, Manna & Sadhukhan

desenvolveram um método de análise de micronúcleos em brânquias de tilápias (*Oreochromis mossambicus*) tratadas com raios-X e dois produtos químicos e constataram que as brânquias apresentam maior sensibilidade à exposição de agentes mutagênicos quando comparadas a outros tecidos.

Recentemente, Hayashi et al. (1998), em estudo sobre o desenvolvimento e avaliação de sistemas de monitoramento empregando organismos aquáticos, compararam a frequência de micronúcleos nos eritrócitos e em células branquiais de diversas espécies de peixes, verificando que a frequência era maior em células branquiais, atribuindo o fato à exposição direta sofrida pelas brânquias aos contaminantes ambientais. Resultados similares tiveram Ueda et al. (1992) quando aplicaram o teste em *Oreochromis mossambicus* e Çavas & Ergene-Gözükar (2003), aplicando o teste em *Oreochromis niloticus*.

O teste do micronúcleo pode também ser realizado em larvas de peixes através de esmagamento e esfregaço de fígado (HOSE et al., 1984), que é o órgão hematopoiético durante os estágios larvais.

Williams & Metcalfe (1992) desenvolveram o teste do micronúcleo *in vivo* em células hepáticas de *Oncorhynchus mykiss*. O teste teve resposta positiva para as substâncias testadas (EMS-etilmetanosulfonato, MMC-mitomomicina C e DEN-dietilnitrosamina). Os autores comentaram que hepatócitos são bastante sensíveis aos clastógenos, possivelmente devido à grande exposição dessas células aos xenobióticos. Entretanto, uma das desvantagens de se utilizar o fígado como tecido-alvo seria o fato dos hepatócitos não se dividirem continuamente e uma injúria nesse órgão deve ser induzida para estimular a proliferação regenerativa para que os efeitos clastogênicos possam ser visualizados.

O teste do micronúcleo, aplicado em qualquer tipo de célula, é dependente do ciclo celular, visto que os danos induzidos no primeiro ciclo serão visíveis como micronúcleo no citoplasma durante o segundo ou subsequente ciclo celular (TATES et al., 1980). Em geral o comprimento do ciclo celular nos organismos depende do tempo necessário para a replicação do DNA e da divisão nuclear. Em mamíferos, a duração desse ciclo em vários tecidos já está bem documentada, porém, há poucos dados a respeito da duração do ciclo celular em tecidos de espécies de peixes teleósteos, principalmente porque o ciclo varia de acordo com a temperatura. Em geral, a indução

máxima de micronúcleos em espécies de peixes ocorre dentro de 1 a 5 dias após exposição ao agente estudado (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Grisolia & Cordeiro (2000) fizeram uma avaliação da indução de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de três espécies de peixes, *Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*. O tratamento com citocalasina B teve como objetivo analisar a proporção de células binucleadas/mononucleadas em diferentes períodos de tratamento para a comparação com os picos de micronúcleos entre as diferentes espécies. Os autores concluíram que o pico de ocorrência de micronúcleos ocorreu do 2º ao 7º dia.

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção de micronúcleos em peixes expostos a clastógenos. Ayllón & Garcia-Vazquez (2000) afirmaram que a injeção intraperitoneal de substâncias tóxicas é o método mais comum de exposição a que os peixes são submetidos quando os efeitos de substâncias mutagênicas são testadas em condições de laboratório.

Em mamíferos, o estresse provocado pela injeção intraperitoneal de substâncias químicas pode induzir adutos de DNA, aberrações cromossômicas e micronúcleos (INGEL et al., 1993). Segundo Ayllón & Garcia-Vazquez (2000) este método poderia também influenciar os resultados dos ensaios mutagênicos em peixes, alterando, por exemplo, o ciclo celular desses organismos. Entretanto, os mesmos autores avaliaram o papel do estresse provocado pela injeção intraperitoneal na indução de micronúcleos em *Phoxinus phoxinus* e *Poecilia latipinna* e demonstraram que este método não interfere de forma significativa a frequência de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares. Porém, dados na literatura indicam que para outras espécies de peixes, condições de estresse causam mudanças hormonais e metabólicas, podendo influenciar a resposta dos animais tratados a agentes genotóxicos (HARREL et al., 1992; HONTELLA et al., 1995). Recentemente, o método de injeção intraperitoneal da substância a ser avaliada foi questionado, uma vez que no campo, os poluentes são dissolvidos ou suspensos na água, portanto a aplicação direta desses resultados experimentais nos ecossistemas de água doce teria que ser revista, segundo Rodriguez-Cea et al., 2003.

Nos últimos anos a aplicação do teste do micronúcleo em peixes tem sido bastante discutida e alguns problemas metodológicos têm sido descritos (AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ, 2000). Um deles é a falta de sensibilidade demonstrada por

algumas espécies. Hose et al. (1987) utilizaram o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes (*Genyonemus lineatus* e *Paralabrus clathratus*) de um rio do sul da Califórnia, porém os autores mostraram que a presença de DDT e PCB no ambiente, não resultou em um aumento significativo na frequência de micronúcleos. Além disso, *Phoxinus phoxinus* mostrou-se pouco sensível a diferentes produtos, tais como metais pesados (SANCHEZ-GALAN et al, 1998) e *Genyonemus lineatus* apresentou baixa sensibilidade a poluentes ambientais (CARRASCO et al, 1990). De acordo com os dados disponíveis na literatura, Williams & Metcalfe (1992) afirmaram que a formação de micronúcleos espontâneos em peixes parece ser menos freqüente do que em roedores e que essa freqüência depende da metodologia utilizada. Em laboratório, muitas condições interferem na indução de micronúcleos nestes organismos, tais como a espécie testada, o protocolo experimental (que pode variar entre os laboratórios), a temperatura da água, etc. (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Outro problema é a falta de consenso sobre o tipo de irregularidades da morfologia nuclear que podem ser consideradas como análogas ao micronúcleo, isto é, resultado da ação de um agente mutagênico, pois os mecanismos da formação de tais lesões ainda não estão totalmente esclarecidas (AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ 2000; 2001; ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA , 2003).

Alterações da morfologia nuclear em eritrócitos de peixes foram fotografadas e descritas por Carrasco et al. (1990) como: “blebbed nuclei”, que corresponde a um núcleo com uma pequena evaginação do envelope nuclear, aparentando conter eucromatina ou, algumas vezes, heterocromatina. Os “blebs” podem estar unidos ao núcleo da célula por uma estrutura nucleoplasmática; “lobed nuclei”, correspondendo a núcleos com evaginações maiores que os “blebs”, mas sem a mesma delimitação. Alterações morfológicas do núcleo foram incluídas nesta categoria, como por exemplo, simples aumento da superfície nuclear, formando múltiplos lóbulos, constituindo um núcleo disforme; “notched nuclei”, descrito como uma invaginação da membrana nuclear. Segundo Carrasco et al. (1990), núcleos “notches”, parecem não conter material nuclear no local invaginado. No experimento conduzido por estes autores, a largura desta lesão parecia similar ao diâmetro de vacúolos nucleares observados em eritrócitos de *Genyonemus lineatus*. Em algumas células, vacúolos pareciam estar presentes em regiões mais internas do “notch”.

No trabalho acima citado, não foram encontradas 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 a contaminantes.

Ao contrário do proposto por Carrasco et al. (1990), De Flora et al. (1991a, b, 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, têm sido utilizadas por vários autores com esta finalidade (BOMBAIL et al., 2001; PACHECO & SANTOS, 1998; AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

Ayllón & Garcia-Vazquez (2001) estudaram a possível indução de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares em eritrócitos do rim de *Oncorhynchus mykiss* utilizando vários compostos de diferentes efeitos. Os autores encontraram resposta positiva para os químicos testados e concluíram que as anormalidades encontradas deveriam ser incluídas nos testes de rotina, quando peixes são empregados como espécies experimentais.

5.4. Peixes como organismos-teste e considerações sobre *Oreochromis niloticus*

Nos ecossistemas marinhos e de água doce, uma grande variedade de organismos, tais como peixes (HAYASHI et al., 1998) e anfíbios (BÉKAERT et al., 1999), tem sido largamente empregados como bioindicadores para monitorar áreas com diferentes níveis de poluição.

Dentre os organismos utilizados como bioindicadores, os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de Toxicologia Aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental (POWERS, 1989).

De acordo com Harshbarger & Clark (1990), os peixes são expostos a substâncias tóxicas de maneira similar a outros vertebrados, podendo ser utilizados para a avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos.

Além disso, peixes desempenham diferentes papéis na cadeia trófica, sendo capazes de bioacumular, de forma direta, contaminantes dissolvidos na água. Acumulam também contaminantes de forma indireta, quando estes são incorporados por ingestão de outros organismos contaminados, viventes no mesmo ambiente (MINISSI et al., 1996).

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-SABIT & METCALFE, 1995).

De acordo com Kligerman (1982), Tsoi (1970, 1974) e Tsoi et al. (1975) foram os primeiros pesquisadores a investigarem os efeitos de agentes mutagênicos químicos no material genético de peixes e Longwell (1976) realizou um trabalho pioneiro analisando danos cromossômicos em peixes coletados em ambientes poluídos.

Segundo Sanchez-Galan et al. (1998), teoricamente, uma espécie de peixe ideal para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade é aquela que apresenta os seguintes critérios: (1) é largamente distribuída em vários ecossistemas; (2) sensível o bastante para detectar poluentes, mesmo em baixas concentrações; (3) é adequada para trabalhos em laboratório; (4) em populações naturais permite a captura de indivíduos sem detrimento para a conservação da espécie.

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 substâncias 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, Chilidae) 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. Em 1982, esta espécie foi introduzida na região Sudeste do país (TANAKA, 2001).

Oreochromis niloticus 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, sendo também encontrada no rio Paraíba do Sul (HILSDORF & PETRERE JR, 2002).

5.5. Características da área de estudo

O Vale do Paraíba constitui importante região no cenário nacional, devido ao seu passado histórico e pela sua posição de destaque na vida econômica, social e política do país.

A cidade de São José dos Campos está localizada às margens da rodovia Presidente Dutra, na região do Vale do Paraíba. Com uma população de 532.717 habitantes, caracteriza-se por ser uma cidade de cunho industrial. As principais atividades econômicas são as indústrias, a refinaria de petróleo, o comércio e a pecuária leiteira. Entre os anos de 1985 a 2001, São José dos Campos obteve o maior índice de crescimento populacional representativo para a região do Vale do Paraíba e do Estado de São Paulo, atingindo importante posição entre as cidades em desenvolvimento tecnológico e um acúmulo de grande potencial industrial para atender a oferta de mão de obra no Vale do Paraíba (PASIN, 2001).

O principal rio que abastece a cidade de São José dos Campos é o Paraíba do Sul, formado pela confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna (Figura 1). A Bacia do rio Paraíba do Sul abrange três estados da Região Sudeste: São Paulo (na região conhecida como Vale do Paraíba), metade do Estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais (na região denominada Zona da Mata Mineira). Em toda essa extensão há atualmente 180 municípios, 36 dos quais estão inseridos parcialmente na Bacia (CEIVAP - Comitê para Integração da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul, 2001).

A população urbana total da Bacia, segundo o Censo 2000, do IBGE, é de 4.922.779 habitantes, sendo que desses, 2.142.397 vivem no Estado do Rio de Janeiro, 1.632.670 em Minas Gerais e 1.147.712 em São Paulo.

A parte paulista da Bacia está localizada entre as coordenadas 22°24' e 23°39' de latitude Sul e 44°10' e 46°26' de longitude Oeste, abrangendo uma área de drenagem de 13.605 km² (PASIN, 2001).

De acordo com o CEIVAP (2001), de maneira geral, a Bacia do rio Paraíba do Sul apresenta clima tropical com temperatura média anual que oscila entre 18°C e 24°C. O regime de chuvas é caracterizado por um período seco, que se estende de junho a setembro, e um período muito chuvoso, que abrange os meses de novembro a janeiro,

quando ocorrem as grandes cheias do rio Paraíba do Sul. Especificamente na região que abrange o município de São José dos Campos, o tipo climático predominante, segundo Setzer (1966) é Cwa (sistema Köppen), caracterizado por clima de inverno seco e verão chuvoso, cuja temperatura do mês mais frio é inferior a 18°C e a do mês mais quente não ultrapassa os 22°C. O índice pluviométrico varia entre 1.100mm a 1.700mm anuais.

Segundo Amorim (1998), o maior problema que aflige as áreas urbanas do Vale do Paraíba é constituído pela contaminação das águas do rio Paraíba do Sul, pelos esgotos sanitários e disposição inadequada de resíduos industriais. Cerca de 1 bilhão de litros de esgotos sanitários, praticamente sem tratamento, são lançados por dia, nos rios da Bacia do rio Paraíba do Sul, além dos efluentes industriais, muitas vezes tóxicos, e de toda a espécie de lixo que a própria população atira em suas águas. Tais problemas ambientais agravam a qualidade das águas, contribuindo para a degradação da qualidade da Bacia, que é de extrema importância para o desenvolvimento da região do Vale do Paraíba.

Dos 34 municípios presentes na porção paulista da Bacia do Paraíba, apenas 13 tem algum tipo de tratamento de efluentes domésticos: São José dos Campos, Lorena, Roseira, Pindamonhangaba, Caçapava, Igaratá, Redenção da Serra, Natividade da Serra, Lagoinha, Bananal, Silveiras, Jambuí e Monteiro Lobato. Com relação à poluição hídrica de origem industrial, apenas 18 do total de indústrias presentes na Bacia do rio Paraíba do Sul, concentradas principalmente ao longo do trecho da Rodovia Presidente Dutra, entre Jacareí e Guaratinguetá, são responsáveis por 85% dos despejos lançados nas águas dos rios (AMORIM, 1998).

5.6. Padrões de qualidade de água para a saúde pública, classificação das águas (segundo resolução CONAMA 20/1986) e o rio Paraíba do Sul

De acordo com a origem, características, componentes, destino e uso das águas de ambientes lóticos, foram estabelecidos padrões para a classificação das águas. A resolução CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) nº 20 de 18 de junho de 1986, estabeleceu, para o território nacional, os seguintes critérios de classificação de águas doces, salinas e salobras:

- **Classe especial:** águas destinadas ao abastecimento doméstico em estado natural, sem prévia ou simples desinfecção, preservando o equilíbrio natural das

comunidades aquáticas, com restrições à presença de coliformes e qualquer outro tipo de rejeitos;

- **Classe 1:** águas destinadas ao abastecimento doméstico após tratamento simples de desinfecção, à proteção de comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças e de frutas cultivadas rente ao solo e consumidas cruas e a aqüicultura de espécies destinadas à alimentação humana, com padrões de qualidade que restringem substâncias lipídicas, microrganismos patogênicos, como coliformes, substâncias orgânicas e inorgânicas, cancerígenas ou tóxicas como metais pesados, biocidas, organoclorados e fosforados, carbamatos, além de substâncias que eliminem odor, formem depósitos e flutuem. Esses padrões são também estendidos às águas de classes 2 e 3;
- **Classe 2:** águas destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário (natação, esqui-aquático e mergulho), à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas e à aqüicultura;
- **Classe 3:** águas destinadas ao abastecimento doméstico após tratamento convencional, à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras e à dessedentação de animais;
- **Classe 4:** águas destinadas à navegação, à harmonia paisagística e a outros usos menos exigentes, com padrão de qualidade que restringe apenas os materiais sedimentáveis, flutuantes e algumas substâncias químicas;
- **Classe 5 e 6:** águas salinas (alto teor de cloreto de sódio – marinha);
- **Classes 7 e 8:** águas salobras (acentuado teor de sais como bicarbonatos, cloretos, nitratos de cálcio e magnésio), sendo diferenciadas pelo tipo de uso a que se destinam.

De acordo com esta classificação o trecho do rio Paraíba do Sul, foco de estudo desse trabalho, pertence à classe 2 (Figura 1).

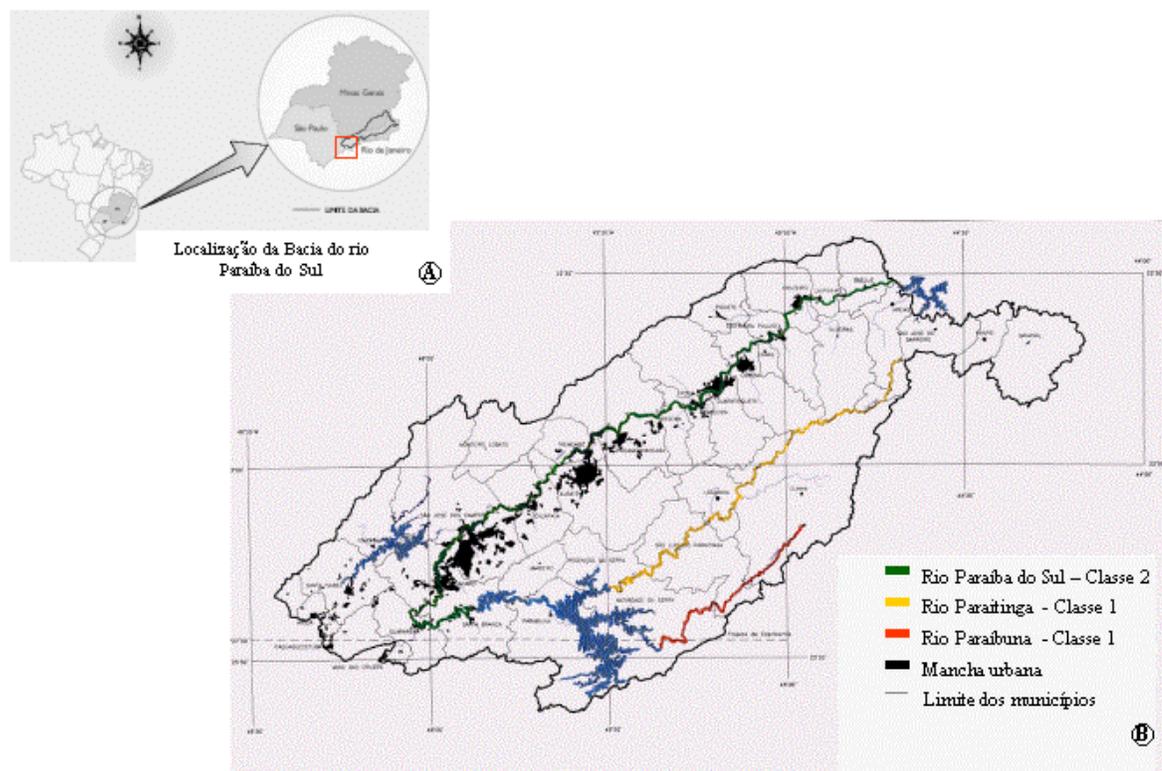


Figura 1. A. Localização da Bacia do Rio Paraíba do Sul, que abrange os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Detalhe em vermelho: porção paulista da Bacia. B. Porção paulista da Bacia e classificação das águas do rio Paraíba do Sul e de seus formadores: rio Paraibuna e rio Paraitinga, segundo Resolução CONAMA 20/86.

5.7. Efluentes industriais e efluentes de refinaria de petróleo

Despejos brutos ou efluentes são definidos como misturas complexas de centenas ou milhares de diferentes compostos, cada um manifestando diversidade química, física e propriedades toxicológicas (HOUK, 1992).

A grande diversidade de processos e materiais utilizados nas atividades industriais é responsável pela variedade de produtos que podem contaminar o ambiente (RISER & ROBERTS, 1992).

Os contaminantes ambientais podem ser separados em dois grandes grupos: inorgânicos e orgânicos. Dentre os compostos inorgânicos, os metais pesados e seus derivados, cianetos e sulfetos representam papel preponderante (WIECZOREK, 2003). Compostos orgânicos como pesticidas, bifenilpoliclorados (PCBs), solventes orgânicos clorados, entre outros, representam também importante papel na contaminação. A produção mundial de substâncias orgânicas sintéticas está estimada em 300 milhões de toneladas/ano. Um estudo conduzido pela EPA (Environmental Protection Agency) indica que os compostos orgânicos são os contaminantes mais comuns encontrados no ambiente (RISER & ROBERTS, 1992).

Dentre os compostos orgânicos, o petróleo e seus derivados ocupam lugar de destaque, devido ao enorme aumento verificado nos últimos anos na produção e industrialização (WIECZOREK, 2003). O petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, que apresenta contaminações variadas de enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais. A composição exata dessa mistura varia significativamente em função do seu reservatório de origem. No seu estado bruto, o petróleo tem pouquíssimas aplicações, servindo quase que somente como óleo combustível. Para que o potencial energético do petróleo seja aproveitado ao máximo, ele deve ser submetido a uma série de processos, a fim de se desdobrar nos seus diversos derivados. Esses processos constituem o refino do petróleo (MARIANO, 2001).

Os produtos derivados do refino do petróleo são de grande interesse comercial. O refino engloba etapas físicas e químicas de separação, que originam as grandes frações de destilação. Estas frações são então processadas através de uma outra série de etapas de separação e conversão que fornecem os derivados finais do petróleo. Refinar petróleo é, portanto, separar as frações desejadas, processá-las e lhes dar acabamento, de modo a se obterem produtos vendáveis (NEIVA, 1983).

A importância do refino dentro de toda a cadeia produtiva do petróleo não se resume apenas ao ponto de vista estratégico. Do ponto de vista ambiental, as refinarias são grandes geradoras de poluição. Elas consomem grandes quantidades de água e de energia, produzem grandes quantidades de despejos líquidos, liberam diversos gases nocivos para a atmosfera e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição (MARIANO, 2001).

Em decorrência de tais fatos, a indústria de refino de petróleo, pode ser, e muitas vezes é, uma grande degradadora do meio ambiente, pois tem potencial para afetá-lo em todos os níveis: ar, água, solo e, conseqüentemente, a todos os seres vivos que habitam nosso planeta.

Os efluentes líquidos gerados são tratados em estações de tratamento de efluentes situadas nas próprias refinarias. Após o tratamento, os efluentes são então, lançados em estações de tratamento públicas ou em corpos aquáticos receptores, desde que atendam à legislação ambiental concernente. Cada etapa do processo pode acrescentar ao efluente final, complexas misturas de substâncias químicas (NEMEROW, 1971; BRITO, 1996; WIECZOREK, 2003).

Muitas refinarias liberam hidrocarbonetos líquidos no solo ou mesmo em águas superficiais. Em algumas refinarias, a contaminação do solo migra, escoando para águas superficiais próximas. Tal problema, dependendo dos volumes liberados, é grave e representa um substancial risco para o meio ambiente e para a saúde humana (MARIANO, 2001).

Brito (1996) destacou que as substâncias encontradas com mais freqüência nos efluentes de todas as refinarias de petróleo são as substâncias cáusticas residuais, sulfídricas, fenólicas, amoniacais e de hidrocarbonetos. Moraes (2000b) e Braile & Cavalcanti (1993) citaram também sólidos em suspensão e dissolvidos, sais, metais pesados, cloretos, cianetos e fosfatos.

A Tabela 1 apresenta as características do efluente de refinaria de petróleo, enquanto a Tabela 2 fornece a relação dos compostos tóxicos normalmente encontrados nos efluentes de refinaria de petróleo, assim como as respectivas concentrações na qual eles se tornam tóxicos para peixes.

Tabela 1. Características do efluente de refinaria.

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura	22	41
pH	6,2	10,6
DBO (mg/L)	17	280
DQO (mg/L)	140	3340
Sulfatos	0	182
Cloretos	19	1080
NH ₃ (mg/L)	0	120
Fósforo (mg/L)	0	97
Óleo (mg/L)	23	200
Alcalinidade (mg/L)	77	356
Dureza	139	510

Fonte: Braile & Cavalcanti (1993).

Tabela 2. Compostos tóxicos normalmente encontrados nos despejos de refinarias de petróleo e limite de toxicidade a peixes.

Composto tóxico	Concentração média (mg/L)	Limite de toxicidade a peixes (mg/L)
Cádmio	0,04	0,10
Cromo	0,28	0,70
Cobre	0,07	0,15
Chumbo	0,23	2,50
Níquel	0,11	1,50
Fenol	154	40
Sulfetos	24	4
Zinco	0,17	1

Fonte: Braile & Cavalcanti (1993).

White et al. (1996) investigaram o efluente de 42 indústrias, dentre as quais refinarias de petróleo, detectando altas concentrações de substâncias genotóxicas.

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), presentes no efluente de refinarias, são descritos como os principais componentes capazes de causar danos no DNA (HAMOUTENE et al., 2002), pois possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas.

Citotoxicidade de efluentes de refinaria tem sido descrita como causa da ação de compostos hidrofóbicos, tais como fenóis substituídos e PAHs, contaminantes potencias de efluentes de refinaria (FENT & HUNN, 1996; SCHIRMER et al., 1998).

Schirmer et al. (2001) verificaram que o efluente de uma refinaria de petróleo do Canadá foi capaz de induzir citotoxicidade em linhagens de cultura de células de peixe (*Oncorhynchus mykiss*).

Odeigah et al. (1997) realizaram experimentos especificamente com efluente de indústria petrolífera na Nigéria, utilizando o teste de *Allium cepa*. Os resultados obtidos apontaram citotoxicidade geral, estimada pela inibição do crescimento das raízes, citotoxicidade, indicada pela redução da atividade proliferativa e genotoxicidade, constatada pelas altas frequências de aberrações cromossômicas.

Lubianca et al. (2003) avaliaram o Arroio Bom Jardim, afluente do rio Caí em Triunfo/RS, que sofre influência do Pólo Petroquímico do Sul, através do ensaio do cometa e do teste do micronúcleo em *Loricariichthys anus* (cascudo). Os resultados obtidos pelos autores apontaram comprometimento da qualidade do rio, resultante das atividades da indústria petroquímica.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Material biológico

O organismo teste utilizado neste trabalho foi *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo. No total foram utilizados 80 indivíduos com tamanho médio de 15cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimens, oriundos de piscicultura (UNESP - Campus de São José do Rio Preto), foram trazidos ao Departamento de Bioquímica da UNESP – Campus de Rio Claro, onde foram aclimatados por uma semana em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistema de filtragem e aeração.

6.2. Localização da área de estudo e coleta das amostras de água

A água utilizada no presente trabalho foi coletada em maio, agosto e novembro de 2004 e em janeiro de 2005, no rio Paraíba do Sul (Figura 2A), numa área influenciada por uma refinaria de petróleo, localizada no município de São José dos Campos – SP (Figura 2B). As amostras de água foram coletadas de barco, numa profundidade de 30 cm e transportadas em frasco âmbar até o Laboratório de

Toxicidade de Águas da UNESP – Campus de Rio Claro, onde foram mantidas a 4°C até o início dos experimentos. Três pontos de coleta foram estabelecidos:

Ponto 1- Montante do despejo do efluente da refinaria de petróleo

Localização: 23K0410312

UTM7441024

Ponto 2 – Local de despejo do efluente da refinaria de petróleo

Localização: 23K0314313

UTM7441303

Ponto 3 - Jusante do despejo do efluente da refinaria de petróleo

Localização: 23K0413995

UTM7441523

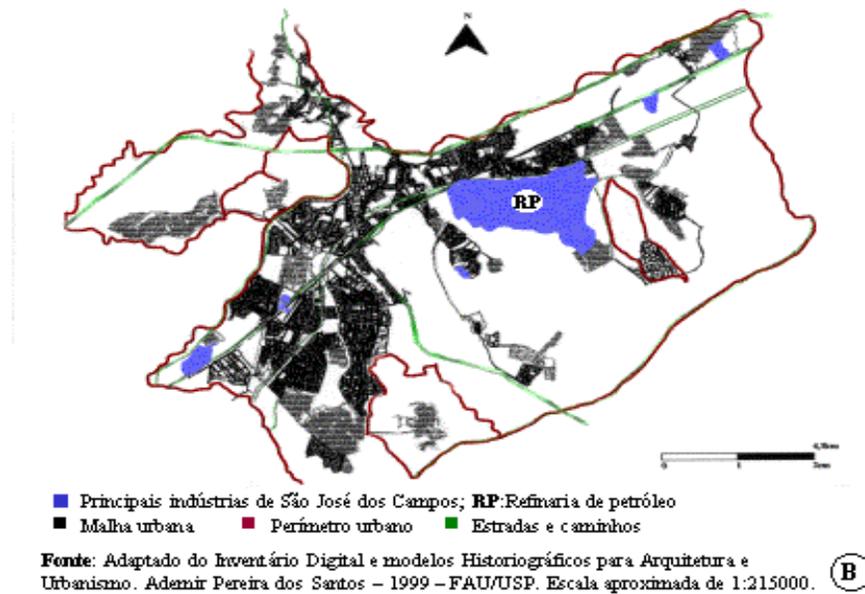


Figura 2. A. Rio Paraíba do Sul e localização dos pontos de coleta de água. P1: montante do despejo; P2: local do despejo do efluente da refinaria de petróleo; P3: jusante do despejo. B. Município de São José dos Campos e localização de suas principais indústrias. RP: Refinaria de petróleo.

6.3. Bioensaio

Para o bioensaio foram utilizados 4 aquários. Em um deles, foi realizado o teste controle com água de poço artesiano. Nos 3 aquários restantes foram colocadas as amostras de água oriundas das coletas realizadas. Cada aquário recebeu 12 litros de água, que permaneceu aerando por 48 horas. Após esse período, 5 peixes foram colocados aleatoriamente em cada aquário, onde permaneceram por 72 horas, para serem assim estimados os efeitos dos possíveis contaminantes das águas do rio Paraíba do Sul.

6.4. Preparação das lâminas para ensaio do cometa

A metodologia utilizada para o ensaio do cometa foi a técnica alcalina descrita por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Primeiramente, lâminas foram mergulhadas em agarose normal (ponto de fusão normal) 1,5% a 60°C, secas e armazenadas em geladeira. Após punção cardíaca com seringas heparinizadas, uma amostra de 5 µl do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µl de soro bovino fetal. As lâminas pré-gelatinizadas foram montadas com 10 µl da suspensão celular + 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37° C. Uma lamínula foi adicionada sobre cada lâmina e a seguir as mesmas permaneceram na geladeira por 20 minutos para solidificação do gel. Após este período, as lâminulas foram removidas e as lâminas foram mantidas em solução de lise gelada e recém preparada (1ml de triton X-100, 10 ml de DMSO e 89ml de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, 8,0g de NaOH sólido, 10g de lauryl sarcosinato sódico para 1litro), em geladeira, por no mínimo 1 hora, sob proteção da luz. A solução de lise é uma solução detergente contendo altas concentrações de sais, que promovem a desintegração das membranas celulares. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão alcalino (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH ~13) à 4°C. A cuba foi disposta num banho de gelo e a corrida de eletroforese foi realizada com voltagem constante (25V) e amperagem de 280-300mA, por 20 minutos. Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e a desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA. As lâminas foram, a seguir, neutralizadas com tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos para a remoção de sais e detergentes, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100% por 10 minutos

para precipitar o DNA e secar a agarose. Todos os passos acima foram realizados na ausência de luz.

As lâminas foram secas a temperatura ambiente e estocadas. A coloração foi realizada com solução aquosa de brometo de etídio (0.02 mg/ml) no momento da análise. O brometo de etídio é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação UV. Para cada peixe foram analisados aleatoriamente 100 nucleóides, num total de 500 por ponto de coleta mais o tratamento controle. Foi utilizado microscópio de fluorescência, filtro B – 3⁴ (excitação: $\lambda = 420\text{nm}-490\text{nm}$, barreira: $\lambda = 520\text{nm}$), em objetiva de 40x.

Para a quantificação de migração e análise de distribuição dos cometas, dois parâmetros de genotoxicidade foram utilizados: classificação visual dos cometas/nucleóides segundo Kobayashi et al. (1995) e score do dano.

De acordo com a migração dos fragmentos de DNA, os nucleóides foram classificados em:

- **classe 0:** nenhum dano, ou seja, nucleóides que não apresentaram cauda;
- **classe 1:** pequeno dano, ou seja, nucleóides apresentando um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça;
- **classe 2:** dano médio, ou seja, com nucleóides apresentando um tamanho de cauda equivalente a uma ou duas vezes o tamanho do diâmetro da cabeça;
- **classe 3:** dano grande, ou seja, com nucleóides apresentando o tamanho da cauda superior a duas vezes o diâmetro da cabeça.

O escore de cada tratamento foi verificado multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3). Os nucleóides totalmente fragmentados não foram considerados, pois representam células em processo de morte celular (HARTMANN & SPEIT, 1997). Para análise estatística foi utilizado o teste do χ^2 .

6.5. Teste do micronúcleo

De cada animal foi retirado em torno de 0,3cc de sangue, por meio de punção cardíaca, realizada com seringas heparinizadas. Logo após a punção, a agulha foi limpa com papel absorvente, para evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e muco. A primeira gota foi descartada para evitar contaminação do sangue por fluídos corpóreos, as gotas posteriores foram utilizadas para confecção das lâminas por meio da

técnica de esfregaço (extensões sangüíneas). Estas gotas praticamente não contêm heparina que, em excesso, pode alterar a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, prejudicar a coloração.

Foram realizadas três extensões sangüíneas para cada indivíduo. O material foi fixado em metanol absoluto por 10 minutos e depois de 24 horas as lâminas foram submetidas a uma hidrólise em HCl 1N por 11 minutos em banho-maria à 60 °C. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em Reativo de Schiff por duas horas.

Para cada peixe foram analisados 3.000 eritrócitos, sob objetiva de imersão (aumento 1000 X), para a determinação da freqüência de células micronucleadas. Alguns critérios foram adotados para a identificação de micronúcleos (HUBER et al. (1983): boa preservação e coloração do citoplasma e núcleo; micronúcleo e o núcleo principal dentro do mesmo citoplasma; ausência de conexão entre núcleo e micronúcleo, diâmetro máximo do micronúcleo não deve ultrapassar a metade do núcleo (se for maior, a célula é considerada binucleada); manutenção da esfericidade do núcleo e micronúcleo. Durante a análise citológica, muitas preparações apresentaram uma freqüência relativamente alta de eritrócitos em processo de morte celular, células binucleadas, brotos celulares, *broken-eggs* e anormalidades da morfologia nuclear (CARRASCO et al., 1990). Por este motivo, decidiu-se anotar também suas freqüências. As anormalidades descritas por Carrasco et al. (1990) foram conjuntamente consideradas para a análise estatística, pois a origem das mesmas ainda não está totalmente esclarecida (AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ, 2001).

O teste estatístico utilizado para comparação dos resultados de cada grupo de tratamento, com o tratamento controle foi o Qui-quadrado (χ^2).

6.6. Dados meteorológicos da região

Dados climatológicos da Estação Meteorológica de Superfície de São José dos Campos referentes aos meses de coleta de amostras de água do rio Paraíba do Sul, foram obtidos junto ao Departamento de Controle de Espaço Aéreo – Serviço de Proteção ao Vôo de São Paulo. Os dados levantados foram: média mensal das temperaturas mínima e máxima, umidade relativa do ar, precipitação total e número total de dias chuvosos.

7. RESULTADOS

Durante a realização desta dissertação foram produzidos dois artigos, os quais estão em fase de envio para revistas especializadas.

ARTIGO 1.

Ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) para avaliação do potencial genotóxico do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo.

Tatiana da Silva Souza & Carmem Silvia Fontanetti

ARTIGO 2.

Avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul, que recebe efluente de refinaria de petróleo por meio da indução de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae).

Tatiana da Silva Souza e Carmem Silvia Fontanetti

ARTIGO 1**Ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae)
para avaliação do potencial genotóxico do rio Paraíba do Sul, numa área sob
influência de uma refinaria de petróleo**

Tatiana da Silva Souza¹ & Carmem S. Fontanetti¹

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.
UNESP, Avenida 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro – SP, Brasil

Correspondência para: Tatiana da Silva Souza

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
(UNESP)

Av. 24A, nº 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro – SP, Brasil

Telefone: (55) 19 3526-4156, FAX: (55) 19 3526-4136

e-mail: tssouza@rc.unesp.br

Manuscrito a ser submetido à Revista “Environmental and Molecular Mutagenesis”

**Ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae)
para avaliação do potencial genotóxico do rio Paraíba do Sul, numa área sob
influência de uma refinaria de petróleo**

Resumo

A contaminação de águas de rios que recebem efluentes industriais tem sido avaliada, nos últimos anos, através de ensaios biológicos e da mensuração de danos ocorridos no DNA de organismos expostos às águas poluídas. O presente trabalho apresenta os resultados da avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul, numa área influenciada por uma refinaria de petróleo. Para tal finalidade, o ensaio do cometa foi aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos às amostras de água do rio, coletadas em diferentes épocas do ano. As amostras foram coletadas em três pontos distintos: montante do despejo do efluente da refinaria (ponto 1), no local de despejo (ponto 2) e a jusante do despejo (ponto 3). Água de poço artesiano foi utilizada como controle. Em todos os meses de coleta, as frequências de nucleóides pertencentes às classes 2 e 3 (classificados segundo Kobayashi et al., 1995), foram significativas em relação ao controle para os pontos correspondentes ao local do despejo do efluente da refinaria e a jusante do mesmo. Os resultados indicaram a presença de substâncias com potencial genotóxico no rio Paraíba do Sul, na região influenciada pela refinaria de petróleo. Concluímos também, que o ensaio do cometa poderia ser rotineiramente requerido pelos órgãos governamentais para detecção de agentes potencialmente poluidores, que são lançados no meio aquático.

Palavras-chave: genotoxicidade, *Oreochromis niloticus*, biomonitoramento, ensaio do cometa.

1. Introdução

A manutenção do equilíbrio de ecossistemas aquáticos e terrestres depende, fundamentalmente, da qualidade de seus mananciais de água. Por esta razão, faz-se necessário um bom entendimento do nível de exposição e do impacto de agentes genotóxicos no meio ambiente.

Lesões no DNA de organismos que habitam ecossistemas aquáticos têm sido associadas com redução no crescimento, desenvolvimento anormal e redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos (LEE et al., 1999; STEINERT, 1999).

Uma variedade de métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de lesões no DNA. Uma das técnicas mais recentes é o ensaio do cometa, capaz de detectar quebras no material genético das células (SINGH et al., 1988). As quebras podem ser introduzidas diretamente por compostos genotóxicos, através da indução de apoptose ou necrose, secundariamente através da interação com espécies reativas de oxigênio ou como consequência da excisão de enzimas de reparo (PARK et al., 1991; EASTMAN & BARRY, 1992; SPEIT & HARTMANN, 1995).

Demonstrações da correlação positiva de quebras na fita de DNA, com propriedades genotóxicas de poluentes ambientais, têm permitido a aplicação do ensaio do cometa nos estudos de Genética Toxicológica e biomonitoramento de ecossistemas aquáticos (TICE, 1995; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998). Entretanto, dados utilizando o ensaio do cometa em peixes têm sido reportados somente nos últimos anos (RUSSO et al., 2004).

Comparado com outros testes de genotoxicidade, a vantagem do ensaio do cometa consiste na detecção de pequenos danos no DNA, no pequeno número de células requeridas para o teste, flexibilidade, baixo custo, fácil aplicação, habilidade de conduzir o experimento com pequena quantidade da substância teste e curto período de tempo para a realização do experimento (TICE, 2000).

Este trabalho objetivou aplicar o ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (tilápia) para avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul, numa área influenciada por uma refinaria de petróleo. Além de ser uma espécie de ampla distribuição geográfica e de ser comercialmente importante, *O. niloticus* constitui excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais, sendo frequentemente utilizada para a

investigação da toxicidade de substâncias contaminantes de ecossistemas aquáticos (ALVES-COSTA, 2001, ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

A avaliação da possível genotoxicidade do rio Paraíba do Sul, provocada pelo despejo do efluente da refinaria de petróleo é necessária, pois este rio é extremamente importante para a região do Vale do Paraíba e para os Estados da região Sudeste do país, visto que a população local depende de suas águas para consumo, para as atividades econômicas, de subsistência e lazer. Além disso, a manutenção da qualidade da água do Paraíba do Sul é imprescindível para os seres vivos componentes da fauna e flora presentes neste ecossistema.

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

O organismo teste utilizado neste trabalho foi *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo. No total foram utilizados 80 indivíduos com tamanho médio de 15cm. Os espécimens, oriundos de piscicultura (UNESP - Campus de São José do Rio Preto), foram trazidos ao Laboratório de Toxicidade de Águas da UNESP de Rio Claro, onde foram aclimatados por uma semana em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistema de filtragem e aeração.

2.2. Área de estudo e coleta das amostras de água

Amostras de água foram coletadas ao longo do rio Paraíba do Sul, município de São José dos Campos, numa área influenciada por uma refinaria de petróleo. As coletas foram sazonais realizadas nos meses de maio, agosto e novembro de 2004 e em janeiro de 2005. Três pontos de coleta foram estabelecidos: Ponto 1 (P1) - montante do despejo (localização: 23K0410312, UTM7441024); Ponto 2 (P2) - despejo da refinaria de petróleo (localização: 23K0314313, UTM7441303) e Ponto 3 (P3) - jusante do despejo (localização: 23K0413995, UTM7441523). As amostras de água coletadas foram transportadas em frasco âmbar, no gelo, até o Departamento de Bioquímica da UNESP de Rio Claro, onde permaneceram à 4°C até o início do experimento.

Dados climatológicos da Estação Meteorológica de Superfície de São José dos Campos referentes aos meses de coleta de amostras de água do rio Paraíba do Sul, foram obtidos junto ao Departamento de Controle de Espaço Aéreo – Serviço de Proteção ao

Vão de São Paulo (Tabela 1). Maio e agosto de 2004 corresponderam aos meses com menor índice pluviométrico, constituindo a estação seca, enquanto novembro de 2004 e janeiro de 2005, a estação chuvosa.

2.3. Bioensaio

Para o bioensaio foram utilizados 4 aquários. Em um deles foi realizado o teste controle com água de poço artesiano. Nos 3 aquários restantes foram colocadas as amostras de água oriundas das coletas realizadas. Cada aquário recebeu 12 L de água, que permaneceu aerando por 48 horas. Após esse período, 5 peixes foram colocados aleatoriamente em cada aquário, onde permaneceram por 72 horas, para serem assim estimados os efeitos dos possíveis contaminantes das águas do rio Paraíba do Sul. Durante o experimento os animais não foram alimentados.

2.4. Ensaio do cometa

A metodologia utilizada para o ensaio do cometa foi a descrita por Singh et al. (1988), após algumas modificações. Primeiramente, lâminas foram mergulhadas em agarose normal (ponto de fusão normal) 1,5% a 60°C, secas e armazenadas em geladeira. Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca com seringas heparinizadas. Uma amostra de 5 µl do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µl de soro bovino fetal. As lâminas foram montadas com 10 µl da suspensão celular + 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37° C. As lâminas foram mantidas em solução de lise (1ml de triton X-100, 10 ml de DMSO e 89ml de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de lauryl sarcosinato sódico para 1litro), em geladeira, por no mínimo 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH ~13) à 4°C, em corrente de 25V, 300mA. As lâminas permaneceram 20 minutos na cuba antes da corrida de eletroforese e foram, a seguir, neutralizadas com tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100% por 10 minutos. A coloração foi feita com brometo de etídio (0.02 mg/ml). Para cada peixe foram analisados aleatoriamente 100 nucleóides. Foi utilizado microscópio de fluorescência, filtro B – 3⁴ (excitação: i=420n-490nM, barreira: I= 520 nM), em objetiva de 40x. Os nucleóides foram classificados visualmente de acordo com a migração dos fragmentos em: classe 0: nenhum ou pouco dano; classe 1: pequeno dano;

classe 2: médio dano; classe 3: grande dano (KOBAYASHI et al., 1995). Também foram verificados os escores de cada tratamento. O teste do χ^2 foi utilizado para comparar a frequência de nucleóides com danos, em cada classe de migração, de cada ponto de coleta com o tratamento controle.

3. Resultados

A análise dos resultados do ensaio do cometa aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos às amostras de água do rio Paraíba do Sul, em diferentes épocas do ano, indicou alta genotoxicidade na área influenciada pela refinaria de petróleo.

Neste estudo, a frequência de nucleóides em cada classe de migração e o escore do dano foram utilizados como parâmetros de genotoxicidade. Foram observadas todas as classes de migração dos cometas, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995) (Figura 1).

Analisando a distribuição dos cometas em cada classe, verificou-se que, em todos os meses de coleta, a frequência de nucleóides pertencentes às classes 2 e 3 (danos mais severos ao DNA) foram significativas em relação ao controle para os pontos correspondentes ao local do despejo do efluente da refinaria (ponto 2) e a jusante do mesmo (ponto 3) (Figura 2A - D, Tabelas 2 - 5); este fato também pôde ser percebido através da análise do escore do dano, cujos menores valores foram observados no controle e na montante e os maiores valores nos pontos 2 e 3 (Tabelas 2 - 5). Entretanto, em agosto de 2004, as frequências de nucleóides pertencentes às classes 1, 2 e 3 também diferiram estatisticamente na montante (ponto 1), sendo que, neste ponto de coleta, a maioria dos cometas pertenceu à classe 1 (Figura 2B, Tabela 3).

4. Discussão

Os resultados positivos para o ensaio do cometa, em todos os meses de coleta, principalmente nos pontos 2 e 3, sugerem que o efluente final da refinaria de petróleo lançado neste local, está influenciando a qualidade da água do rio Paraíba do Sul.

Exposições a agentes genotóxicos, presentes no meio aquático, podem levar a perda da integridade do DNA, como demonstrado neste estudo, pelo alto índice de

quebras, resultando em cometas de classes 2 e 3, encontradas no material genético dos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Entretanto, o significado biológico do ensaio do cometa ainda não está totalmente esclarecido, uma vez que as quebras no DNA detectadas por esta técnica, podem ser formadas através de vários mecanismos (ROJAS et al., 1999).

De acordo com Kamman et al. (2001), a fragmentação ou quebra de fitas de DNA é considerada uma lesão potencialmente pré-mutagênica, pois tais quebras estão correlacionadas com muitas propriedades mutagênicas e carcinogênicas de diversos poluentes ambientais. As quebras que ocorrem na dupla fita de DNA são mais relevantes, pois são mais difíceis de serem reparadas, podendo constituir, posteriormente, lesões letais ou mutagênicas nos organismos expostos (COLLINS et al., 1997). Pessoas que venham a beber água poluída também correm o risco de sofrer efeito genotóxico similar e desenvolver várias doenças a longo prazo (DE FLORA et al., 1993; PARANJPE et al., 1994)

Geralmente, vários fatores afetam o grau de poluição de um rio, como condições hidrológicas e climáticas do ecossistema. Variações sazonais desses fatores tem um grande efeito na concentração de poluentes no meio aquático (VEGA et al., 1998, FERREIRA et al., 1994).

Neste trabalho, diferenças sazonais foram observadas no mês de agosto, em que foi detectada a presença de agentes genotóxicos na montante do despejo. Provavelmente, esses agentes, capazes de causar pequenos danos nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, são provenientes de uma fonte de poluição localizada acima do despejo do efluente da refinaria de petróleo. No mês de agosto, a incidência de chuvas é escassa na região estudada e, portanto, o volume de água do rio tende a diminuir. Provavelmente, esse fator contribuiu para uma maior concentração de poluentes na montante. Nos outros meses do ano, não foi observada nenhuma influência sazonal.

Embora, ainda sejam escassos os estudos em que o ensaio do cometa *in vivo* é aplicado em espécies de peixes, nossos resultados confirmaram a utilização desta técnica como uma ferramenta bastante sensível para a detecção de genotoxicidade no meio aquático, corroborando com os resultados obtidos por Pandrangi et al. (1995) e Russo et al. (2004).

O rio Paraíba do Sul não é considerado poluído pela população e autoridades locais, sendo permitido qualquer tipo de atividade em suas águas. Contudo, seria

conveniente que os antigos conceitos de poluição fossem revistos, uma vez que, no presente estudo, ficou evidente o potencial de risco de suas águas, principalmente no ponto de despejo da refinaria de petróleo sobre o sistema-teste utilizado. Apesar deste efluente receber tratamento antes de ser lançado no rio, diante dos resultados obtidos neste trabalho, constatou-se que tal tratamento não é eficiente para a eliminação de agentes genotóxicos. A continuidade de estudos biológicos, para a detecção de genotoxicidade é de extrema importância para monitorar os locais mais comprometidos do rio Paraíba do Sul. Tal monitoramento poderia levantar subsídios para a melhoria da qualidade do efluente das indústrias potencialmente poluidoras.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Toxicidade de Águas - Departamento de Bioquímica da UNESP de Rio Claro por ter disponibilizado o laboratório em que os bioensaios foram realizados, ao Valdenilson José Alves de Oliveira e ao Marcelo Sousa Camargo pela coleta das amostras de água, a Profa. Dra. Eliana Gonçalves da UNESP de São José do Rio Preto, por ter nos cedido os exemplares de *Oreochromis niloticus*, ao Departamento de Controle de Espaço Aéreo – Serviço de Proteção ao Vôo de São Paulo por ter nos fornecido os dados ambientais da cidade de São José dos Campos e a ao Programa de Recursos Humanos da ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista - UNESP-Rio Claro pelo suporte financeiro.

5. Referências Bibliográficas

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. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it tell us? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 375, p. 183-193, 1997.

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.

EASTMAN, A.; BARRY, M. A. The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair or apoptosis? **Cancer Invest.**, New York, v. 10, p. 229-240, 1992.

FERREIRA, C. J. A.; SORIANO, B. M. A.; GALDINO, S.; HAMILTON, S. K. Anthropogenic factors affecting waters of the Pantanal wetland and associated rivers in the upper Paraguay river basin of Brazil. **Revista Limnológica Brasiliensis**, v. 5, p. 135-148, 1994.

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

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. **MMS Comm**, v. 3, p. 103-115, 1995.

LEE, R. F.; STEINERT, S.A.; NAKAYAMA, K.; OSHIMA, Y. Use of DNA damage (comet assay) and embryo development defects to assess contaminant exposure by blue crab (*C. sapidus*) embryos,. In: HENSHEL, D. S.; BLACK, M. C; HARRASS, M. C. (Eds.). **Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment**, v. 8, ASTM STP 1364, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, 1999. p. 341-349.

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

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

PARANJPE, M. G.; CHANDRA, A. M. S.; QUALLS, C. W.; MC-MURRY, S. T.; ROHRER, M. D.; WHALEY, M. M.; LOCHMILLER, R. L.; MCBEE, K. Fluorosis in a wild cotton rat *Sigmodon hispidus* population inhabiting a petrochemical waste site, **Toxicology and Pathology**, Lawrence, v. 6, n. 22, p. 569-578, 1994.

PARK, J. K.; LEE, J. S.; LEE, H. H.; CHOI, I. S.; PARK, S. D. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced single-strand breaks is attributed to slower rejoining processes by DNA polymerase inhibitor, cytosine arabinoside in CHO-K1 cells. **Life Science**, Elmsford, v. 48, p. 1255-1261, 1991.

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

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

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

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, New York, v. 10, n. 6, p. 555-559, 1995.

STEINERT, S.A. DNA damage as bivalve biomarker and as an environmental assessment tool. **Biomarkers**, v. 4, p. 492–496, 1999.

TICE, R. R. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H.; VENITT, S. (Eds.), **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers, Oxford, 1995, p. 315-339.

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, 206-221p., 2000.

VEGA, M.; PARDO, R.; BARRADO, E.; DEBÁN, L. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. **Water Research**, Amsterdam, v. 32, n. 12, 3581-3592, 1998.

Tabela 1. Dados ambientais da cidade de São José dos Campos – SP referentes aos períodos de coleta das amostras de água do rio Paraíba do Sul.

Período de coleta	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação Total (mm)	Nº total de dias chuvosos
Maio/2004	24,60	17,92	45,36	3,41	10
Agosto/2004	20,24	12,30	57,35	2,0	2
Novembro/2004	25,00	22,00	73,00	85,0	15
Janeiro/2005	26,00	23,00	84,00	101,0	18

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

Tabela 2. Genotoxicidade das águas do rio Paraíba do Sul, através do ensaio do cometa aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Coleta: Maio de 2004.

Ponto de coleta	Total de nucleóides analisados	Total de nucleóides com cometa	Classe				Escores
			0	1	2	3	
Controle	100	7	93	3	4	0	11
	100	5	95	0	5	0	10
	100	25	75	18	7	0	32
	100	15	85	14	1	0	16
	100	15	85	11	1	3	22
Total	500	67	433	46	18	3	x = 18,2
Ponto 1 (montante)	100	14	86	5	5	4	27
	100	16	84	5	10	1	28
	100	15	85	15	0	0	15
	100	27	73	14	10	3	43
	100	18	82	12	5	1	25
Total	500	90	410	51	30	9	x = 27,6
Ponto 2 (despejo)	100	90	10	15	35	40	205
	100	94	6	18	45	31	201
	100	90	10	15	35	40	205
	100	95	5	10	10	75	255
	100	98	2	7	35	56	245
Total	500	467	33	65	160**	242**	x = 222,2
Ponto 3 (jusante)	100	98	2	13	20	65	248
	100	98	2	15	25	58	239
	100	95	5	10	20	65	224
	100	81	19	18	30	33	177
	100	95	5	6	14	75	259
Total	500	467	33	62	109**	296**	x = 229,4

Nota: os valores seguidos de ** diferiram significativamente ($p < 0,001$) em relação ao controle.

Classificação das classes de migração segundo Kobayashi et al. (1995).

Tabela 3. Genotoxicidade das águas do rio Paraíba do Sul, através do ensaio do cometa aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Coleta: Agosto de 2004.

Ponto de coleta	Total de nucleóides analisados	Total de nucleóides com cometa	Classe				Escores
			0	1	2	3	
Controle	100	20	80	10	10	0	30
	100	7	93	0	0	7	21
	100	29	71	4	10	15	69
	100	28	72	18	5	5	43
	100	15	85	15	0	0	15
Total	500	99	401	47	25	27	x=35,6
Ponto 1 (montante)	100	70	30	50	20	0	90
	100	76	24	33	19	24	143
	100	52	48	27	24	1	78
	100	46	54	15	7	24	101
	100	52	48	11	26	15	108
Total	500	296	204	136**	96**	64*	x=104
Ponto 2 (despejo)	100	84	16	11	35	38	195
	100	100	0	1	39	60	259
	100	86	14	29	42	15	158
	100	93	7	14	47	32	204
	100	99	1	19	14	66	245
Total	500	462	38	74	177**	211**	x=212,2
Ponto 3 (jusante)	100	70	30	0	33	37	177
	100	99	1	4	26	69	263
	100	89	11	26	40	23	175
	100	74	26	2	20	52	198
	100	97	3	30	26	41	205
Total	500	429	71	62	145**	222**	x=203,6

Nota: os valores seguidos de ** diferiram significativamente ($p < 0,001$) em relação ao controle. Os valores seguidos de * diferiram significativamente ($p < 0,01$) em relação ao controle.

Classificação das classes de migração segundo Kobayashi et al. (1995).

Tabela 4. Genotoxicidade das águas do rio Paraíba do Sul, através do ensaio do cometa aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Coleta: Novembro de 2004.

Ponto de coleta	Total de nucleóides analisados	Total de nucleóides com cometa	Classe				Escores
			0	1	2	3	
Controle	100	47	53	17	20	10	87
	100	30	70	15	10	5	50
	100	55	45	0	23	32	142
	100	25	75	11	7	7	46
	100	41	59	10	27	4	76
Total	500	198	302	53	87	58	x=80,2
Ponto 1 (montante)	100	60	50	20	20	10	90
	100	37	63	12	25	0	42
	100	41	59	21	10	10	71
	100	40	60	10	15	15	85
	100	45	59	20	15	6	68
Total	500	223	291	83	85	41	x=71,2
Ponto 2 (despejo)	100	85	15	18	25	42	194
	100	98	2	13	38	47	230
	100	90	10	26	49	15	169
	100	97	3	18	32	47	223
	100	98	2	20	73	5	211
Total	500	468	32	95*	217**	156**	x=205,4
Ponto 3 (jusante)	100	97	3	12	21	64	246
	100	90	10	10	20	60	230
	100	74	26	27	32	15	136
	100	85	15	18	42	25	177
	100	90	10	14	35	41	207
Total	500	436	64	81	150*	205**	x=199,2

Nota: os valores seguidos de ** diferiram significativamente ($p < 0,001$) em relação ao controle. Os valores seguidos de * diferiram significativamente ($p < 0,01$) em relação ao controle. Classificação das classes de migração segundo Kobayashi et al. (1995).

Tabela 5. Genotoxicidade das águas do rio Paraíba do Sul, através do ensaio do cometa aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Coleta: Janeiro de 2005.

Ponto de coleta	Total de nucleóides analisados	Total de nucleóides com cometa	Classe				Escores
			0	1	2	3	
Controle	100	14	86	14	0	0	14
	100	3	97	0	0	3	3
	100	17	83	14	3	0	20
	100	35	65	25	5	5	50
	100	35	65	12	23	0	58
Total	500	104	396	65	31	8	x = 29
Ponto 1 (montante)	100	31	69	31	0	0	31
	100	15	85	5	10	0	25
	100	24	76	24	0	0	24
	100	35	65	12	20	3	61
	100	36	64	22	5	9	59
Total	500	141	359	94	35	12	x = 40
Ponto 2 (despejo)	100	97	3	58	14	25	161
	100	97	3	39	32	26	181
	100	93	7	5	11	77	258
	100	99	1	24	43	32	206
	100	98	2	19	30	49	177
Total	500	484	16	145**	130**	209**	x = 196,6
Ponto 3 (jusante)	100	93	7	44	44	5	147
	100	90	10	20	27	43	203
	100	92	8	8	24	60	236
	100	97	3	19	24	54	229
	100	81	19	5	50	26	183
Total	500	453	47	96	169**	188**	x = 199,6

Nota: os valores seguidos de ** diferiram significativamente ($p < 0,001$) em relação ao controle. Classificação das classes de migração segundo Kobayashi et al. (1995).

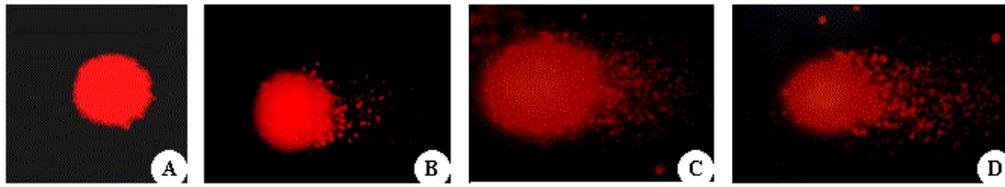


Figura 1. Ensaio de cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição às águas do rio Paraíba do Sul. A. Classe 0 (DNA intacto); B. Classe 1 (DNA com baixo nível de dano); C. Classe 2 (DNA com nível médio de dano); D. Classe 3 (DNA com nível alto de dano). Aumento 1000x.

Nota: classificação dos nucleóides segundo Kobayashi et al. (1995).

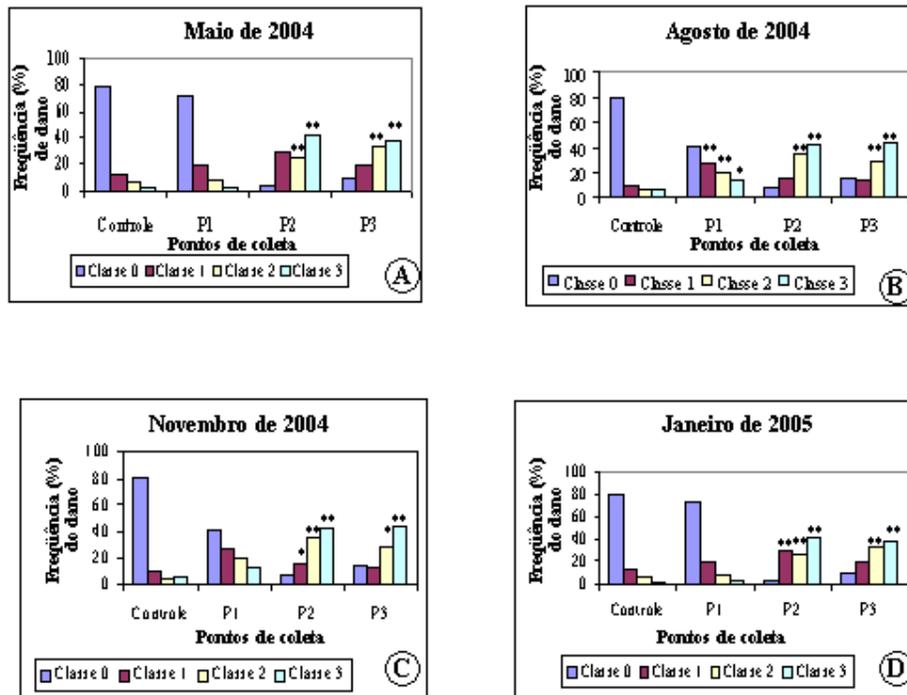


Figura 2. Distribuição da frequência de nucleóides com cometa em cada classe de dano considerada, encontrada nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, em cada ponto e mês de coleta das amostras de água do rio Paraíba do Sul. P1: montante do despejo do efluente da refinaria de petróleo; P2: local do despejo do efluente; P3: jusante do despejo.

Nota: os valores seguidos de** diferiram significativamente ($p < 0,001$) em relação ao controle. Os valores seguidos de * diferiram significativamente ($p < 0,01$) em relação ao controle. Classificação das classes de migração segundo Kobayashi et al. (1995).

ARTIGO 2

Avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul, que recebe efluente de refinaria de petróleo, por meio do teste do micronúcleo e de alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae)

Tatiana da Silva Souza* & Carmem S. Fontanetti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil
UNESP, Avenida 24-A, 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro – SP, Brasil

Correspondência para: Tatiana da Silva Souza

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Av. 24A, nº 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro – SP, Brasil

Telefone: (55) 19 3526-4156, FAX: (55) 19 3526-4136

*e-mail: tssouza@rc.unesp.br

Manuscrito a ser submetido à Revista “Mutation Research”

Avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul, que recebe efluente de refinaria de petróleo, por meio do teste do micronúcleo e de alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae)

Resumo

O teste do micronúcleo e de alterações nucleares foi aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, para avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul, numa área que recebe efluente de uma refinaria de petróleo, localizada no município de São José dos Campos, Brasil - SP. As amostras de água foram coletadas nos meses de maio e agosto de 2004 (estação seca) e em novembro de 2004 e janeiro de 2005 (estação chuvosa), em três pontos distintos, totalizando 12 amostras. Foi possível detectar a presença de substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico e substâncias com potencial citotóxico, principalmente no local correspondente ao despejo do efluente da refinaria de petróleo. A maior incidência de micronúcleos e de alterações nucleares ocorreu nos meses de maio e agosto, enquanto os resultados biológicos obtidos nos meses de novembro e janeiro não foram significativos, a não ser pela frequência significativa de células em processo de morte celular no mês de novembro. Provavelmente, este processo contribui para a eliminação de células com lesões pré- mutagênicas/mutagênicas.

Palavras-chave: Teste do micronúcleo, *Oreochromis niloticus*, mutagenicidade, biomonitoramento, petróleo.

1. Introdução

Micronúcleos podem ser formados a partir da interação de agentes químicos, físicos ou biológicos com alvos não genômicos, como o fuso mitótico e o cinetócoro, promovendo distúrbios na maquinaria mitótica e, conseqüentemente, mal segregação dos cromossomos. Esses agentes podem também atuar diretamente no DNA, gerando quebras cromossômicas, que podem ser visualizadas e quantificadas através do teste do micronúcleo.

O teste do micronúcleo vem sendo aplicado para avaliar a mutagenicidade ambiental através de bioindicadores da qualidade dos ecossistemas. Conseqüentemente, para a avaliação da qualidade do meio aquático, este teste tem sido realizado em diversos organismos, como mexilhões [1] e, principalmente peixes [2].

Além de constituir uma ferramenta importante para diagnosticar o meio ambiente, após influências antrópicas, uma elevação da freqüência de micronúcleos pode detectar a presença de agentes mutagênicos, podendo ainda indicar um aumento na probabilidade da ocorrência de uma alteração cromossômica específica, estrutural ou numérica, que desencadeie a expressão de um oncogene relacionado com a transformação neoplásica [3].

Durante a análise de micronúcleos, alguns pesquisadores têm observado a existência de outras anormalidades nucleares, sugerindo que estas devem ser contadas concomitantemente à análise convencional de micronúcleos [4-7]. Essas anomalias estão relacionadas aos erros que ocorrem durante a divisão celular, com os processos de morte celular - necrose e apoptose, e com genotoxicidade e/ou mutagenicidade [8-10]. Em peixes, algumas dessas alterações nucleares, têm sido reportadas, após a exposição à agentes químicos ou águas poluídas [11].

A formação de alterações da morfologia do envoltório nuclear, descritas por Carrasco et al. [12] como “blebbed”, “lobed” e “notched” também têm sido reportadas em eritrócitos de peixes, como conseqüência à exposição de contaminantes ambientais e químicos com ação genotóxica, mutagênica ou carcinogênica conhecida, embora o mecanismo de formação dessas anormalidades ainda não tenha sido esclarecido [13-15].

Neste trabalho, o teste do micronúcleo e de anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) foram utilizados para diagnosticar a qualidade do rio Paraíba do Sul, numa área onde se localiza uma refinaria de petróleo (São José dos Campos-SP). Esta refinaria lança seu efluente, após tratamento, diariamente nas águas deste rio. O tratamento é realizado por meio de floculação, flotação, lagoas aeradas, lodo ativado, biodisco e lagoas de maturação. O diagnóstico ambiental desta área, faz-se necessário, pois este efluente pode

conter substâncias deletérias ao material genético dos seres vivos que entrem em contato com essas águas, podendo afetar, inclusive, a saúde humana.

Além disso, sabendo-se que variações sazonais podem ter um grande efeito na concentração de poluentes na água de rios, resultantes da combinação de condições naturais e antrópicas, tais como mudanças no corpo hídrico devido a maior ou menor índice pluviométrico [16] foi também objetivo deste trabalho avaliar a possível influência da sazonalidade sobre os resultados biológicos obtidos.

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

O organismo-teste utilizado foi *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo. No total foram utilizados 80 indivíduos com tamanho médio de 15cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimens, oriundos de piscicultura (UNESP – Campus de São José do Rio Preto), foram trazidos ao Laboratório de Toxicidade de Águas da UNESP – Campus de Rio Claro, onde foram aclimatados por uma semana em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistema de filtragem e aeração.

2.2. Área de estudo e coleta de água

Amostras de água foram coletadas ao longo do rio Paraíba do Sul, município de São José dos Campos, numa área influenciada por uma refinaria de petróleo (Figura 1). As coletas foram realizadas nos meses de maio, agosto e novembro de 2004 e em janeiro de 2005. Três pontos de coleta, distantes 500m um do outro, foram estabelecidos: Ponto 1 (P1) - montante do despejo; Ponto 2 (P2) – local de despejo do efluente da refinaria de petróleo e Ponto 3 (P3) - jusante do despejo. As amostras foram coletadas numa profundidade de 30 cm e transportadas em frasco âmbar, em gelo, até o Laboratório de Toxicidade de Águas da UNESP - Campus de Rio Claro, onde permaneceram à 4°C até o início do experimento.

Dados climatológicos da Estação Meteorológica de Superfície de São José dos Campos, referentes aos meses de coleta de amostras de água do rio Paraíba do Sul, foram obtidos junto ao Departamento de Controle de Espaço Aéreo – Serviço de Proteção ao Vôo de São Paulo (Tabela 1). De acordo com esses dados, maio e agosto de 2004 corresponderam aos meses com menor

índice pluviométrico, constituindo a estação seca, enquanto novembro de 2004 e janeiro de 2005, constituíram a estação chuvosa.

2.3. Bioensaio

Para o bioensaio foram utilizados 4 aquários. Em um deles foi realizado o teste controle negativo com água de poço artesiano. Nos 3 aquários restantes foram colocadas as amostras de água oriundas das coletas realizadas.

Em cada aquário, cinco peixes foram aleatoriamente colocados, onde permaneceram expostos por 72 horas, para serem assim estimados os efeitos dos possíveis contaminantes das águas do rio Paraíba do Sul. Durante o experimento os peixes não foram alimentados.

2.4. Teste do micronúcleo

De cada animal foi retirado em torno de 0,3cc de sangue, por meio de punção cardíaca, realizada com seringas heparinizadas. As lâminas foram feitas por meio da técnica de esfregação (extensões sangüíneas). Foram realizadas três extensões sangüíneas para cada indivíduo. O material foi fixado em metanol absoluto por 10 minutos e, depois de 24 horas, as lâminas foram submetidas a uma hidrólise em HCl 1N por 11 minutos em banho-maria à 60 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em Reativo de Schiff por duas horas.

Para cada peixe foram analisados 3.000 eritrócitos, sob objetiva de imersão (aumento 1000 X), para a determinação da frequência de células micronucleadas, células binucleadas, *broken-eggs*, brotos nucleares, microcitos, células com características de morte celular e células com alterações da morfologia nuclear, classificadas segundo Carrasco et al. [12]. Como os mecanismos de formação dessas últimas anormalidades ainda não estão esclarecidos, elas foram conjuntamente consideradas para a análise estatística [17]. O teste estatístico utilizado foi o Qui-quadrado (χ^2).

3. Resultados

Os resultados obtidos pela análise de eritrócitos micronucleados (Figura 1A) de *Oreochromis niloticus*, após exposição às amostras de água do rio Paraíba do Sul encontram-se reunidos na Tabela 2. Nos meses de maio e agosto de 2004 foram observados valores significativos de micronúcleos ($p < 0,05$) apenas no ponto 2, correspondente ao local de despejo da

refinaria de petróleo. O mesmo não ocorreu nos meses de novembro de 2004 e janeiro de 2005, nos quais não foram verificados resultados positivos em nenhum dos pontos de amostragem.

Os tipos de alterações nucleares encontradas neste trabalho foram: broto nuclear (seta na Figura 1B), *broken-egg* (não fotografado), microcito (seta na Figura 1C), eritrócitos com características de morte celular: núcleos vacuolizados (Figura 1D), condensação e marginalização da cromatina na periferia do núcleo (seta na Figura 1E), envoltório nuclear desintegrado e material genético fragmentado dentro de um citoplasma intacto (seta na Figura 1F), retração nuclear (Figura 1G), cariólise (Figura 1H) e citoplasma vacuolizado (Figura 1I). Encontramos também eritrócitos binucleados (seta na Figura 1J), eritrócitos binucleados com micronúcleo (Figura 1L), eritrócitos com mais de um micronúcleo (setas na Figura 1M), eritrócitos polinucleados (Figura 1N) e eritrócitos com alterações da morfologia nuclear, classificadas como "notched" (seta na Figura 1O), "lobed" (Figuras 1P) e "blebbed" (Figura 1Q) por Carrasco et al. (1990). As frequências de cada alteração observada, em cada mês de coleta, encontram-se nas Tabelas 3-6.

Em maio, as frequências de eritrócitos binucleados, brotos nucleares, de eritrócitos em processo de morte celular e das alterações descritas por Carrasco et al. [12] foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no ponto 2. A frequência de eritrócitos em morte celular foi significativa ($p < 0,05$) também à jusante do despejo (ponto 3) (Tabela 3).

No mês de agosto, a frequência de brotos nucleares, microcitos, eritrócitos em morte celular e frequência das células com alterações da morfologia nuclear diferiram do controle ($p < 0,05$) no ponto 2 (Tabela 4).

No mês de novembro, apenas os eritrócitos em morte celular diferiram do controle ($p < 0,05$) no ponto 2 (Tabela 5). Em janeiro de 2005, nenhuma alteração nuclear diferiu estatisticamente do controle (Tabela 6).

Considerando a variação temporal dos resultados, os maiores índices de alterações ocorreram na estação seca (maio e agosto de 2004), indicando alguma influência da sazonalidade sobre os resultados biológicos obtidos.

4. Discussão

A maioria das alterações citogenéticas encontradas nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos às águas do rio Paraíba do Sul, foram observadas nas amostras correspondentes ao local de despejo do efluente da refinaria de petróleo (ponto 2), nos meses de maio e agosto de 2004.

O teste do micronúcleo indicou uma possível presença de agentes que estão comprometendo a qualidade da água no trecho estudado do rio Paraíba do Sul, em períodos específicos do ano. Isto sugere que, exposições crônicas à essas águas podem afetar a biota presente neste ecossistema, bem como a saúde da população local.

Recentemente, a presença de anormalidades nucleares, além do micronúcleo, tem sido reportada por diversos autores, tanto em humanos [5-6] quanto em células de peixes [11].

Acreditamos que algumas dessas anormalidades estejam diretamente relacionadas com a formação de micronúcleos. Possivelmente, o broto seja a primeira alteração nuclear originada, como resposta à ação de algum agente. Intensificando essa ação, haveria a formação de um fio Feulgen-positivo, originando o *broken-egg*; mais tarde, esse fio seria rompido, formando o micronúcleo.

Fenech & Crott [18] mostraram a indução de brotos nucleares em linfócitos humanos sob deficiência de ácido fólico. Desde que é conhecido que tal deficiência causa amplificação gênica e quebras no DNA, essa alteração foi considerada como uma consequência de evento mutagênico. Recentes estudos de Serrano-Garcia & Montero-Montaya [19] demonstraram que os brotos nucleares e os micronúcleos possuem a mesma origem, seguindo a exposição de mutágenos (clastogênicos e aneugênicos).

De acordo com Shimizu et al. [20-21] a formação de brotos nucleares seria um dos passos para a formação de micronúcleos e uma das formas de eliminação do dano genético do núcleo principal da célula. Eventualmente, o micronúcleo formado poderia ser excluído da célula, formando um microcito. A duração do processo de extrusão do micronúcleo é ainda desconhecida.

Nos meses de maio e agosto, as frequências de micronúcleos e de brotos nucleares foram estatisticamente positivas no ponto 2, o que nos parece confirmar a relação entre essas duas estruturas. No mês de agosto, em que as frequências dessas anormalidades foram maiores no local de despejo, comparado com os outros meses de coleta, a incidência de microcitos também diferiu do controle. Este fato pode indicar que a formação dessa estrutura seria uma estratégia para a manutenção da integridade celular, através da eliminação de micronúcleos. Não está esclarecido na literatura a maneira pela qual os micronúcleos são expulsos da célula.

Neste trabalho, eritrócitos com características de células apoptóticas e necróticas foram observadas. Segundo Huppertz et al. [22], a caracterização desses tipos celulares baseia-se na morfologia celular e na detecção de fragmentação de DNA por técnicas bioquímicas e histoquímicas. Estudos têm demonstrado que a apoptose e a necrose podem compartilhar

mecanismos comuns nos primeiros estágios de morte celular. De acordo com Saraste & Pulkki [23], a falta de critérios uniformes para diferenciar a apoptose da necrose tem levado a interpretações confusas, principalmente nas situações em que esses dois processos são coexistentes.

A apoptose é uma forma regulada de morte celular, essencial para o desenvolvimento e homeostase dos tecidos [24]. A necrose, por sua vez, ocorre quando as células sofrem injúria, sob condições extremas [25].

Segundo Ramirez & Saldanha [26], o micronúcleo pode ser uma das fases do processo apoptótico e necrótico, uma vez que são estruturas nas quais o material genético torna-se comprometido. Tem sido demonstrado que o gene supressor de tumor TP53, responsável pela checagem do ciclo celular e indução de apoptose em resposta a um dano genético, pode ser expresso no micronúcleo e que esse fato pode ser importante para a determinação de morte da célula micronucleada [27]. Decordier et al. [24] afirmou que o micronúcleo pode constituir um sinal para a apoptose. Porém, para elucidar como o micronúcleo pode desencadear apoptose é preciso informações sobre a constituição específica e a origem do micronúcleo formado.

A morte celular provavelmente constitui um mecanismo para a eliminação de células com lesões pré-mutagênicas/mutagênicas. Elhajouji et al. [28] e Dercodier et al. [24] investigaram a eliminação, através de apoptose, de células micronucleadas tratadas com inibidores dos microtúbulos e verificaram que a apoptose contribui para a eliminação de células aneuplóides.

A análise da frequência de células em processo de morte celular, realizada neste trabalho, em conjunto com a contagem de micronúcleos, é importante, pois segundo Fenech [10], uma célula que sofre a ação de um agente genotóxico e/ou mutagênico pode expressar essa agressão através da formação de um micronúcleo ou, pode entrar em processo de morte celular. Desta maneira, tem-se uma avaliação mais completa do impacto do agente em estudo sobre a célula.

No mês de maio, a incidência de eritrócitos binucleados diferiu do controle no ponto 2, indicando a presença de agentes, neste trecho do rio, com potencial aneugênico. De fato, de acordo com Canevari [29], as células binucleadas originam-se devido à dificuldade de formação do fuso mitótico, ocasionada pela ação aneugênica de algumas substâncias. A formação de células binucleadas é, portanto, representativa de alterações citológicas. Na binucleação, apesar da interferência de eventos tardios à divisão celular, provavelmente não ocorrem interações com o DNA. As conseqüências dessa alteração ainda são desconhecidas [6].

Alterações da morfologia nuclear em eritrócitos de peixes têm sido observadas por diversos autores, quando o teste do micronúcleo é aplicado [30-31]. Essas alterações foram

descritas por Carrasco et al. [12] como “blebbed”, “lobed” e “notched” No presente estudo, correlações positivas entre a frequência total de tais anormalidades e o local com maior influência antrópica (ponto 2) foram observadas. De fato, diversos autores têm utilizado as alterações da morfologia nuclear encontradas em eritrócitos de peixes para monitoramento do meio aquático ou, para a identificação de agentes com potencial mutagênico [32-33].

Entretanto, os exatos mecanismos de formação dessas células com desestruturação da morfologia nuclear, precisam ser esclarecidos através de estudos específicos, para que o teste de alterações nucleares em peixes possa ser padronizado.

Em relação à sazonalidade dos resultados, de acordo com o CEIVAP (Comitê para Integração da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul) [34], o regime de chuvas na Bacia do rio Paraíba do Sul apresenta dois períodos distintos, caracterizados por um período seco (junho a setembro) e por um período com alto índice pluviométrico (novembro a janeiro), quando ocorrem as grandes cheias.

Um déficit de água na estação seca poderia levar a uma maior concentração de poluentes, enquanto que na estação chuvosa poderia ocorrer uma diluição dos contaminantes presentes no rio Paraíba do Sul. De fato, os resultados obtidos neste trabalho, sugerem que a concentração de poluentes é dependente do índice pluviométrico e do balanço hidrológico do rio Paraíba do Sul, visto que uma maior indução de micronúcleos e de todas as outras alterações encontradas ocorreu nos meses de outono e inverno (menor fluxo de água no rio), enquanto incidências menores foram observadas na primavera e verão (maior fluxo de água no rio).

A influência do índice pluviométrico também foi reportada na avaliação da qualidade do rio Caí, Rio Grande do Sul, numa área influenciada por um Complexo Petroquímico através do teste do micronúcleo em cultura de linfócitos humanos [35].

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, o tratamento dado pela refinaria ao seu efluente, minimiza, mas não soluciona totalmente o problema ambiental gerado pelo despejo do mesmo, visto que no ponto de descarte no rio Paraíba do Sul, foi detectada a presença de agentes capazes de promover citotoxicidade e induzir a formação de micronúcleos em eritrócitos de *O. niloticus*, pelo menos em épocas específicas do ano. *Oreochromis niloticus* foi considerado um bom bioindicador nas condições experimentais apresentadas; este fato corrobora com estudos prévios relatados por Grisolia & Cordeiro [36] Palhares & Grisolia (2002). Concluimos ainda que peixes são particularmente adequados para o estabelecimento de relações entre exposição a contaminantes ambientais e danos genéticos. A utilização do teste do micronúcleo pisceio poderia providenciar um maior controle para a emissão de efluentes industriais no meio aquático.

Agradecimentos

Agradecemos a Cristiane Mileo pelo auxílio na montagem da prancha, ao Departamento de Bioquímica da UNESP de Rio Claro por ter disponibilizado o laboratório em que os bioensaios foram realizados, ao Valdenilson José Alves de Oliveira e ao Marcelo Sousa Camargo pela coleta das amostras de água, a Profa. Dra. Eliana Gonçalves da UNESP de São José do Rio Preto, por ter nos cedido os exemplares de *Oreochromis niloticus*, ao Departamento de Controle de Espaço Aéreo – Serviço de Proteção ao Vôo de São Paulo por ter nos fornecido os dados ambientais da cidade de São José dos Campos e a ao Programa de Recursos Humanos da ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista - UNESP-Rio Claro pelo suporte financeiro.

5. Referências Bibliográficas

- [1] S. Kuhnen, J.F. Ferreira, J.M.S. Agostini. Avaliação da frequência de hemócitos micronucleados em mexilhão *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) expostos ao óleo diesel. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, 21 (Suppl. 3): 99, 1998.

- [2] S. Minissi, E. Ciccotti, M. Rizzoni. 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 Res.* 367 (1996) 245-251.

- [3] H.F. Stich, M.P. Rosin. Micronuclei in exfoliated human cells as tool for studies in cancer risk intervention. *Cancer Letters* 22 (1984) 241-253.

- [4] T.M. Schroeder. Investigation of bone marrow smears. In: F. Vogel, G. Röhrborn. (Eds.) *Chemical mutagenesis in mammals and man*. Freiburg: Springer, 1970, pp. 214-219.

- [5] P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuffs users. *Am. J. Epidemiol.* 134 (1991) 840-850.

- [6] P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen. Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Res.* 271 (1992) 69-77.

- [7] M. Fenech, J. Crott, J. Turner, S. Brown. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14 (1999) 605-612.
- [8] T. MD Nakano, K. MD. Oka. Transition of Ki-67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy. *Cancer* 68 (1991) 517-523.
- [9] CORMAK, D. H. Ham's Histologia, 9 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1991. p. 5 e 35.
- [10] M. Fenech. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Res.* 455 (2000) 81-95.
- [11] T. Çavas, S. Ergene-Gözükar. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Res.* 538 (2003) 81-91.
- [12] K.R. Carrasco, K.L. Tilbury, M.S. Mayers. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Science* 47 (1990) 2123-2136.
- [13] M.G. Pacheco, M.A. Santos. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. *Fresenius Environ. Bull.* 5 (1996) 746-751.
- [14] F. Ayllón, E. Garcia-Vazquez. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49 (2001) 221-225.
- [15] D. Palhares, C.K. Grisolia. Comparasion between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology* 25 (2002) 281-284.

- [16] M. Vega, R. Pardo, E. Barrado, L. Debán. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water Research* 32 (1998) 3581-3592.
- [17] M. Pacheco, M.A. Santos. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38 (1997) 252-259.
- [18] M. Fenech, J. Crott. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient in human lymphocytes – evidence for breakage – fusion – bridge cycles in the cytokinesis – block micronucleus assay. *Mutation Res.* 504 (2002) 131-136.
- [19] L. Serrano-Garcia, R. Montero-Montaya. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38 (2001) 38- 45.
- [20] N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama, G.M. Wahl. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell. Biol.* 140 (1998) 1307-1320.
- [21] N. Shimizu, T. Shimuara, T. Tanaka. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Res.* 448 (2000) 81-90.
- [22] B. Huppertz, H-G Frank, P. Haufmann, Cell death. *Anatomy and Embriology* 200 (1999) 1.
- [23] A. Saraste, K. Pulkki. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 45 (2000) 228-237.
- [24] I. Decordier, L. Dillen, E. Cundari, M. Kirsch-Volders. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis* 17 (2002) 337-344.

- [25] L.R. Ribeiro. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, E.K. Marques (Eds.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003, pp.173-200.
- [26] A. Ramirez, P.H. Saldanha. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetics and Molecular Research* 1 (2002) 246-260.
- [27] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van-Hummelen, The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Res.* 392 (1997) 19-30.
- [28] A. Elhajouji, F. Tibaldi, M. Kirsch-Volders. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human lymphocytes. *Mutagenesis* 12 (1997) 133-140.
- [29] R.A. Canevari. Avaliação dos efeitos genotóxicos e diâmetro dos micronúcleos obtidos em *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) submetidos a tratamentos agudos com o inseticida azodrin e o herbicida trifluralina. Monografia (Bacharelado em Biologia Geral), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1996.
- [30] R.N. Hooftman, W.K. De Raat. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Res.* 104 (1982) 147-152.
- [31] C.D. Metcalfe. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40 (1988) 489-495.
- [32] M. Pacheco, M.A. Santos. Induction of Liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 40 (1998) 71-76.

- [33] S. Sanchez-Galan, A.R. Linde, E. Garcia-Vazquez. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicology Environmental Safety* 43 (1999) 301-304.
- [34] CEIVAP (Comitê para Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul), *Programa Curso D'Água/CEIVAP - Relatório final*. Resende, Rio de Janeiro, 2001. Disponível em www.hidro.ufrj.br/pgrh/layout.html. Acesso em: 17 nov. 2004.
- [35] C.T. Lemos, B. Erdtmann. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutation Res.* 467 (2000) 1-9.
- [36] C.K. Grisolia, C.M.T. Cordeiro, Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology* 23 (2000) 235-239.

Tabela 1. Dados ambientais da cidade de São José dos Campos – SP referentes aos períodos de coleta das amostras de água do rio Paraíba do Sul.

Período de coleta	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação Total (mm)	Dias chuvosos
Maio/2004	24,60	17,92	45,36	3,41	10
Agosto/2004	20,24	12,30	57,35	2,0	2
Novembro/2004	25,00	22,00	73,00	85,0	15
Janeiro/2005	26,00	23,00	84,00	101,0	18

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

Tabela 2. Frequência (%) de micronúcleos (MN) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos por 72h às águas do rio Paraíba do Sul.

Período de coleta	Ponto	Total de eritrócitos analisados	Número total de MN observados	Média de MN por peixe e desvio padrão	Frequência (%) de MN observados
Maio/2004	Controle	15000	1	0,2±0,45	0,0067
	Ponto 1	15000	9	1,8±4,02	0,06
	Ponto 2	15000	27	5,4±2,40	0,18*
	Ponto 3	15000	7	1,4±2,19	0,04
Agosto/2004	Controle	15000	3	0,6±0,54	0,02
	Ponto 1	15000	10	2±2,44	0,06
	Ponto 2	15000	47	9,4±3,64	0,31*
	Ponto 3	15000	19	3,8±4,49	0,13
Novembro/2004	Controle	15000	4	0,8±0,37	0,027
	Ponto 1	15000	2	0,4±0,89	0,013
	Ponto 2	15000	11	2,2±0,44	0,07
	Ponto 3	15000	3	0,6±0,54	0,02
Janeiro/2005	Controle	15000	5	1±0,70	0,034
	Ponto 1	15000	3	0,6±0,54	0,02
	Ponto 2	15000	10	2±0,70	0,06
	Ponto 3	15000	2	0,4±0,54	0,013

Nota: valores seguidos por * diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle, pelo teste do χ^2 .

Ponto 1: montante do despejo; Ponto 2: local do despejo do efluente da refinaria de petróleo no rio Paraíba do Sul; Ponto 3: jusante do despejo.

Tabela 3. Número total e frequência de alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 72h às águas do rio Paraíba do Sul. Coleta Maio de 2004.

Alterações	Controle	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Eritrócitos binucleados	1 (0,0067%)	4 (0,026%)	28 (0,186%)*	2 (0,014%)
Eritrócitos binucleados com micronúcleo	0	1 (0,0067%)	1 (0,0067%)	0
Eritrócitos polinucleados	0	0	0	0
Broken-egg	0	0	3 (0,02%)	0
Broto nuclear	1 (0,0067%)	2 (0,014%)	27 (0,18%)*	5 (0,034%)
Microcito	0	0	0	0
Eritrócitos em processo de morte celular	3 (0,02%)	13 (0,08%)	45 (0,30%)*	46 (0,306%)*
Eritrócitos com núcleos “blebbed” + “lobed” + “notched”	6 (0,04%)	15 (0,1%)	68 (0,45%)*	40 (0,27%)
Número total de eritrócitos analisados	15000	15000	15000	15000

Nota: valores seguidos por * diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle, pelo teste do χ^2 .

Ponto 1: montante do despejo; Ponto 2: local do despejo do efluente da refinaria de petróleo no rio Paraíba do Sul; Ponto 3: jusante do despejo

Tabela 4. Número total e frequência de alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 72h às águas do rio Paraíba do Sul. Coleta Agosto de 2004.

Alterações	Controle	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Eritrócitos binucleados	1 (0,0067%)	1 (0,0067%)	7 (0,046%)	2 (0,014%)
Eritrócitos binucleados com micronúcleo	0	0	0	0
Eritrócitos polinucleados	0	0	2 (0,014%)	0
<i>Broken-egg</i>	0	0	0	0
Broto nuclear	3 (0,02%)	9 (0,06%)	45 (0,30%)*	14 (0,09%)
Microcito	1 (0,0067%)	3 (0,02%)	29 (0,19%)*	4 (0,027%)
Eritrócitos em processo de morte celular	4 (0,027%)	16 (0,106%)	57 (0,38%)*	24 (0,16%)
Eritrócitos com núcleos “blebbed” + “lobed” + “notched”	6 (0,04%)	11 (0,07%)	67 (0,44%)*	34 (0,22%)
Número total de eritrócitos analisados	15000	15000	15000	15000

Nota: valores seguidos por * diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle, pelo teste do χ^2 .

Ponto 1: montante do despejo; Ponto 2: local do despejo do efluente da refinaria de petróleo no rio Paraíba do Sul; Ponto 3: jusante do despejo

Tabela 5. Número total e frequência de alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos por 72h às águas do rio Paraíba do Sul. Coleta: Novembro de 2004.

Alterações	Controle	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Eritrócitos binucleados	3 (0,02%)	2 (0,013%)	10 (0,067%)	5 (0,034%)
Eritrócitos binucleados com micronúcleo	0	0	0	0
Eritrócitos polinucleados	1 (0,0067%)	0	0	2 (0,014%)
<i>Broken-eggs</i>	0	1(0,0067%)	0	0
Broto nuclear	3 (0,02%)	3 (0,02%)	15 (0,10%)	10 (0,067%)
Microcito	0	1 (0,0067%)	0	4 (0,027%)
Eritrócitos em processo de morte celular	2 (0,014%)	8 (0,054%)	39 (0,26%)*	25 (0,17%)
Eritrócitos com núcleos “blebbed” + “lobed” + “notched”	12 (0,08%)	8 (0,054%)	35 (0,24%)	15 (0,10%)
Número total de eritrócitos analisados	15000	15000	15000	15000

Nota: valores seguidos por * diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle, pelo teste do χ^2 .

Ponto 1: montante do despejo; Ponto 2: local do despejo do efluente da refinaria de petróleo no rio Paraíba do Sul; Ponto 3: jusante do despejo.

Tabela 6. Número total e frequência de alterações nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos por 72h às águas do rio Paraíba do Sul. Coleta: Janeiro de 2005.

Alterações	Controle	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Eritrócitos binucleados	2 (0,013%)	1 (0,0067%)	7 (0,047%)	3 (0,02%)
Eritrócitos binucleados com micronúcleo	0	0	0	0
Eritrócitos polinucleados	0	0	0	0
<i>Broken-egg</i>	0	0	0	0
Broto nuclear	0	0	0	0
Microcito	0	0	0	0
Eritrócitos em processo de morte celular	3 (0,02%)	7 (0,047%)	15 (0,10%)	12 (0,08%)
Eritrócitos com núcleos “blebbed” + “lobed” + “notched”	9 (0,06%)	8 (0,054%)	15 (0,10%)	7 (0,047%)
Número total de eritrócitos analisados	15000	15000	15000	15000

Nota: nenhuma alteração nuclear diferiu significativamente do tratamento controle, pelo teste do χ^2 .

Ponto 1: montante do despejo; Ponto 2: local do despejo do efluente da refinaria de petróleo no rio Paraíba do Sul; Ponto 3: jusante do despejo.

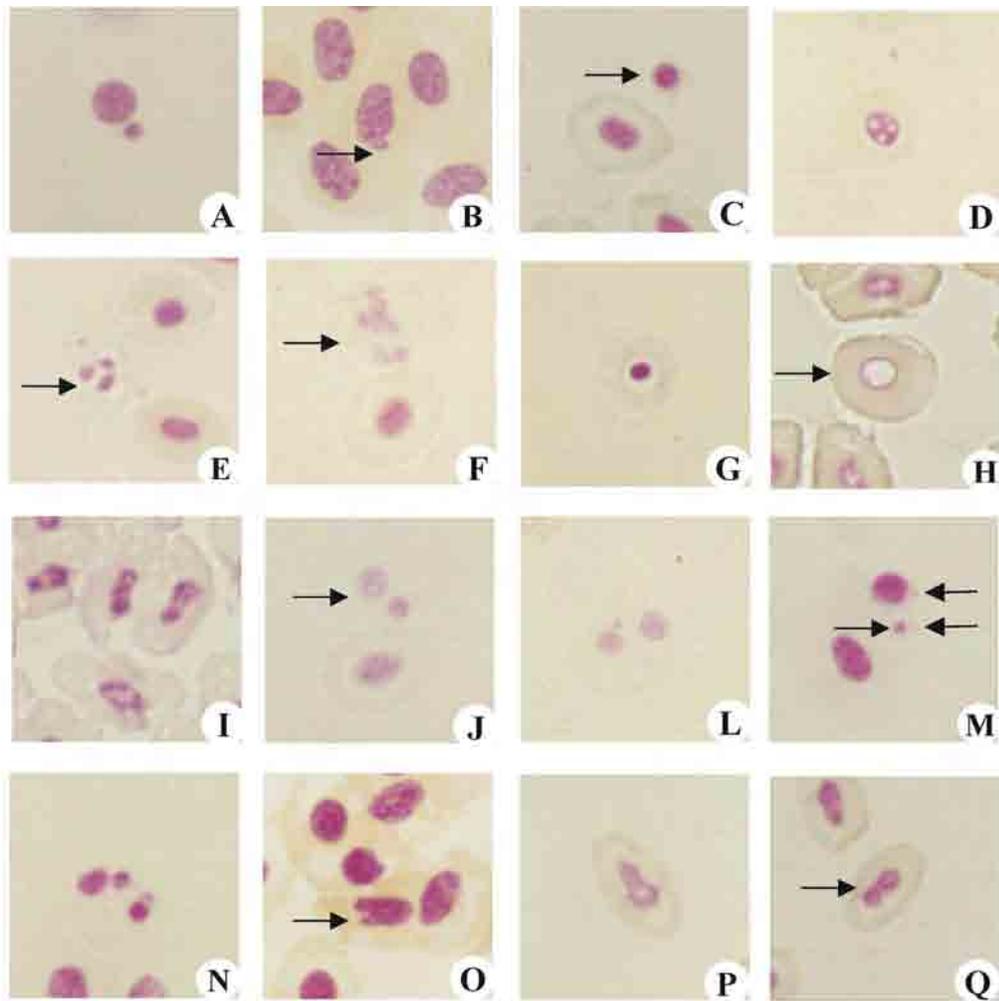


Figura 1. Micronúcleo e alterações nucleares encontrados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após 72h de exposição em amostras de água do rio Paraíba do Sul, que recebe efluente de refinaria de petróleo. **A.** Eritrócito micronucleado. **B.** Eritrócito com broto nuclear (seta). **C.** Microcito (seta). **D.** Eritrócito com núcleo vacuolizado. **E.** Eritrócito com condensação e marginalização da cromatina na periferia do núcleo (seta). **F.** Eritrócito com envoltório nuclear desintegrado e material genético fragmentado dentro do citoplasma (seta). **G.** Eritrócito com retração do material nuclear. **H.** Eritrócito com dissolução do material nuclear (cariólise). **I.** Eritrócitos com citoplasma vacuolizado. **J.** Eritrócito binucleado (seta). **L.** Eritrócito binucleado com micronúcleo. **M.** Eritrócito com mais de um micronúcleo (setas). **N.** Eritrócito polinucleado. **O.** Eritrócito com núcleo do tipo “notched”(seta). **P.** Eritrócito com núcleo do tipo “lobed”. **Q.** Eritrócito com núcleo do tipo “blebbed” (seta). Aumento 1000x.

8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho foram aplicados dois testes citogenéticos, ensaio do cometa e teste do micronúcleo, em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* para a avaliação da qualidade da água do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo.

O objetivo deste estudo não foi identificar os possíveis contaminantes presentes no efluente da refinaria, que é lançado diariamente no rio, visto que a identificação dessas substâncias seria economicamente inviável. Assim, optou-se por verificar se tal efluente, mesmo após tratamento, poderia estar causando danos genéticos em organismos expostos às águas que o recebem. Testes genéticos, utilizando peixes como bioindicadores, são bastante úteis para monitorar o meio aquático, constituindo uma ferramenta complementar às formas tradicionais de avaliação, que utilizam métodos físico-químicos.

Através do ensaio do cometa, constatou-se que o local de despejo do efluente da refinaria de petróleo (ponto 2) e a jusante do mesmo (ponto 3), são os locais que apresentaram a qualidade da água mais comprometida, visto que altas incidências de quebras no DNA, com cometas pertencentes às classes 2 e 3, foram verificadas em eritrócitos de *O. niloticus*. Em um dos meses de coleta (agosto de 2004), as amostras de água do ponto 1 (montante do despejo) também apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, porém com um menor grau de comprometimento, uma vez que a maioria dos cometas observados pertenciam à classe 1, de acordo com a classificação de Kobayashi et al (1995).

Em relação à frequência de micronúcleos e de alterações nucleares, apenas em maio e agosto de 2004, foram encontradas diferenças significativas em eritrócitos de *O. niloticus*, principalmente no ponto 2, quando comparada com a frequência obtida no tratamento controle. Nos outros meses de coleta, novembro de 2004 e janeiro de 2005, incidências menores de alterações foram observadas.

Outro objetivo do presente trabalho foi identificar quais os tipos de alterações nucleares, além do micronúcleo, que poderiam ser encontradas nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após a aplicação do teste do micronúcleo pisceio. A partir de nossos resultados foi constatado que o efluente final da refinaria de petróleo, presente nas águas do rio Paraíba do Sul, provocou clastogenicidade e/ou aneugenicidade, detectadas através da formação de micronúcleos, *broken-eggs*, brotos nucleares, eritrócitos binucleados, eritrócitos binucleados com micronúcleos e eritrócitos polinucleados.

Foi constatado também o potencial citotóxico das águas do rio, detectado a partir da indução de eritrócitos em processo de morte celular. 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, a manutenção do metabolismo normal do indivíduo. Os resultados obtidos através do teste das anormalidades da morfologia nuclear descritas por Carrasco et al. (1990) corroboraram com os de outros autores, que encontraram frequências elevadas de tais anormalidades em peixes que habitam locais poluídos (BOMBAIL et al., 2001), na avaliação de efluentes industriais (ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003) ou que são expostos a diferentes químicos, tanto aneugênicos quanto clastogênicos (PACHECO & SANTOS, 1997; AYLLÓN & GARCIA-VAZQUEZ, 2000; FERRARO et al., 2004). Provavelmente, mudanças morfológicas da estrutura do envelope nuclear estejam relacionadas a processos citotóxicos. Entretanto, como a origem de tais alterações é ainda controversa, mais pesquisas sobre este assunto são uma prioridade para a padronização do teste do micronúcleo em peixes. Essas pesquisas serão importantes também para que se conheçam quais as possíveis conseqüências da formação dessas alterações para a célula e conseqüentemente, para o organismo. A inclusão de outros tipos de alterações nucleares, na contagem de micronúcleos, deve ser considerada, uma vez que a eficiência da técnica pode ser elevada.

De maneira geral, os resultados significativos das anomalias observadas neste estudo, tanto pelo ensaio do cometa, quanto pelo teste do micronúcleo, podem, provavelmente, levar a alterações fisiológicas prejudiciais ou levar à perda da estabilidade genômica, podendo desencadear a perda do controle do ciclo celular em organismos expostos às águas do rio Paraíba do Sul. Deste modo, ficou constatado que o tratamento dado pela refinaria ao seu efluente não é suficientemente eficiente, pelo menos para a minimizar a descarga de compostos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos detectados nas condições experimentais deste trabalho.

A avaliação da qualidade do rio Paraíba do Sul foi feita em diferentes épocas do ano, para verificar se haveria alguma interferência de fatores ambientais sobre os resultados biológicos a serem obtidos. Para tanto, alguns dados meteorológicos da cidade de São José dos Campos foram levantados. O único fator que parece ter influenciado nossos resultados foi uma menor incidência de chuvas nos meses de maio e agosto de 2004, o que teria provocado uma maior concentração de poluentes no rio e contribuído para os resultados positivos para o ensaio do cometa no ponto 1, em agosto, e para o teste do micronúcleo e de alterações nucleares em maio e agosto de 2004, no ponto 2.

Em agosto, a detecção de quebras no DNA dos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos às amostras de água do ponto 1, indicou, provavelmente, a presença de outra fonte de poluição neste local, além da refinaria de petróleo. Uma maior concentração de poluentes, decorrente de uma menor quantidade de chuvas teria influenciado os resultados encontrados nesta época do ano. Nos outros meses de coleta, maiores incidências de chuvas, possivelmente provocaram uma maior dissolução dos poluentes ou dispersão dos mesmos para um local mais distante da fonte poluidora.

Diferentemente do teste do micronúcleo, para o ensaio do cometa, as amostras de águas dos pontos 2 e 3 mostraram-se comprometidas em todos os meses de coleta. Essa diferença entre os dois testes possivelmente seja devido a uma maior sensibilidade do ensaio do cometa, quando comparado com o teste do micronúcleo. De fato, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo possuem naturezas diferentes, cada um com suas vantagens e restrições e, por isso, têm sido aplicados em conjunto para a avaliação de danos genéticos. Enquanto o ensaio do cometa detecta lesões reversíveis, o teste do micronúcleo detecta lesões mais persistentes no DNA ou efeitos aneugênicos que não podem ser reparados (HARTMANN et al., 2001); os danos mensurados pelo ensaio do cometa aparecem mais cedo do que o micronúcleo, que requer uma divisão celular para ser visualizado (DEVENTER, 1996). Além disso, nem sempre a formação de um micronúcleo ocorre na primeira divisão celular, pois um fragmento acêntrico pode sobreviver, replicar e se transformar em micronúcleo em divisões subseqüentes (HEDDLE et al., 1991). Por ser uma técnica bastante sensível, o ensaio do cometa deve ser aplicado com bastante cuidado para que não sejam realizadas interpretações equivocadas dos resultados obtidos.

Oreochromis niloticus foi considerado um bom organismo-teste, nas condições experimentais apresentadas neste trabalho. É uma espécie comum, abundante em muitos rios, de fácil captura, de fácil manutenção em condições de laboratório e comercialmente importante. *O. niloticus* tem sido utilizado em estudos de mutagenicidade, sendo reportada como uma espécie bastante sensível a contaminantes ambientais, clastógenos e substâncias aneugênicas (GRISOLIA & CORDEIRO, 2000; ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

Vale salientar que a partir dos resultados obtidos no presente estudo, outros bioindicadores, além de *Oreochromis niloticus*, e outros testes deveriam ser utilizados em estudos futuros, para a verificação das respostas genéticas de outros organismos frente à situação do rio Paraíba do Sul. Também seria interessante que estudos *in situ* fossem realizados, uma vez que as respostas dos organismos que habitam áreas poluídas por bastante tempo podem diferir das respostas encontradas quando bioensaios são montados. Assim, a fauna local pode tornar-se adaptada a

resistir aos efeitos dos compostos genotóxicos e /ou mutagênicos, através, por exemplo, do aumento da taxa metabólica e aumento da excreção de genotoxinas, bem como através do aumento da taxa de reparo do DNA e/ou taxa de reposição celular. Por outro lado, exposições prolongadas em áreas contaminadas podem resultar num aumento da mortalidade dos indivíduos mais sensíveis, ou ainda, aumentar os índices de danos genéticos e fisiológicos.

O grande desenvolvimento econômico registrado às voltas do rio Paraíba do Sul, ante a implantação de inúmeras indústrias e o surgimento de grandes concentrações humanas - que utilizam as águas desse rio, contribuiu para reduzir a disponibilidade hídrica e degradar a qualidade das águas. Dessa forma, é de fundamental importância o desenvolvimento de estudos para um diagnóstico atualizado do recurso hídrico, aplicando uma metodologia que permita o estabelecimento de planos de ações e de investimentos para atender às metas de qualidade. Assim, espera-se que este trabalho, utilizando bioindicadores da qualidade ambiental, possa subsidiar ações institucionais, na definição de medidas saneadoras para o restabelecimento das condições de desenvolvimento sustentável, visando a qualidade de vida da população e da biota aquática.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLAH, G. A.; EL-FAYOUMI, R. I.; SMITH, M. J.; HECKMANN, R. A.; O'NEILL, K. L. A comparative evaluation of aflatoxin B₁ genotoxicity in fish models using the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 446, p. 181-188, 1999.

AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANIC, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium-induced micronuclei in fish. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 13, n. 5, p. 333-336, 1994.

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. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

AMORIM, D. S. **Qualidade das águas do rio Paraíba do Sul no Vale do Paraíba**. 1998. Dissertação (Mestrado em Planejamento Urbano), Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 1998.

ANITHA, B.; CHANDRA, N.; GOPINATH, P. M.; DARAIRAJ, G. Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*). **Mutation Research**, Amsterdam, v. 469, p. 1-8, 2000.

ARNAIZ, R. R. **Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos**. 2 ed. México, 1995. 267 p.

ATHANASIOU, K.; KYRTOPOULOS, S. A. Mutagenic and clastogenic effects of organic extracts from the Athenian drinking water. **The Science of the Total Environmental**, v. 27, p. 113-120, 1983.

AVISHAI, N.; RABINOWITZ, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay, **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 21-37, 2002.

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.

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

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

BÉKAERT, C.; RAST, C.; FERRIER, V.; BISPO, A.; JOURDAIN, M. J.; VASSEUR, P. Use of *in vitro* (Ames and Mutatox tests) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 30, p. 953-962, 1999.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, New York, v. 11, p. 485-492, 1996.

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

BENNER, E. S.; WARGOVICH, M. J.; LIPPMAN, S. M.; HONG, W. K. Micronuclei: a potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, p. 250-254, 1993. Suppl. 17F.

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.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993.764 p.

BRITO, I. R. C. **Efluentes de refinaria de petróleo: seleção de bactérias autóctones com potencial de biodegradação e redução de toxicidade aguda**. 1996. 156 f. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLLA, I.; BELTRAME, A. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. **Marine Ecology – Progress Series**, Amelinghausen, v. 44, n. 1, p. 65-68, 1988.

CAI, H. Y. Transformation of rat esophageal precancerous epithelial cells and its biologic characteristics-establishment of RE25-3 esophageal carcinoma cell line. **Chung-Hua-Chung-Liu-Tsa-Chih**, v. 10, p. 256-259, 1988.

CAIRNS, J.; McCORMICK, P. V.; NIEDERLEHNER, B. R. A proposal framework for developing indicators of ecosystem health. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 263, p. 1-44, 1993.

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.

CEIVAP (Comitê para Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul), *Programa Curso D'água/CEIVAP – Relatório final*. Resende, Rio de Janeiro, 2001. Disponível em www.hidro.ufrj.br/pgrh/layout.html. Acesso em: 17 nov. 2004.

CHAPMAN, D. T.; PAINE, M. D.; MORAN, T.; KIERSTED, T. Refinery water (intake and effluent) quality-update of 1970s with 1990s toxicity testing. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 13, p. 897-909, 1994.

- CHOY, W. N. Regulatory Genetic Toxicology tests. In: CHOY, W. N. (Ed.). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**, New York: Marcel Dekker, 2001. p. 93-113.
- COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Conformations constraints in nuclear DNA. **Journal of Cell Science**, London, v. 22, p. 287-302, 1976.
- COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei. **European Journal of Biochemistry.**, Berlin, v. 84, p. 465-477, 1978.
- CORMAK, D. M. **Ham's Histologia**, 9 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1991. p. 5 e p. 35.
- CREBELLI, R.; CARERE, A. Aneuploidy assays in routine screening? In: MADDLE, S.; MÜLLER, L. (Eds.). **Corrent issues in Genetic Toxicology**, München, 1993. p. 70-89.
- DAS, R. K.; NANDA, N. K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 175, p. 67-71, 1986.
- De FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCI, P. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special refernce to the Mediterranean Sea. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 258, p. 285-320, 1991a.
- De FLORA, S.; ZANACCI, P.; BAGNASCO, M.; BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; LEVIS, A. G. Metabolic and genetic effect of marine pollution on aquatic organisms. In: GLEDHILL, B.; MAURO, F. (Eds.), **Trends in Biological Dosimetry**, Wiley-Liss, New York, 1991b. p. 69-78.
- 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.
- DEVAUX, A.; PESONEN, M.; MONOD, G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 11, p. 71-79, 1998.

DEVENTER, K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *Danio rerio* by means of single cell gel electrophoresis. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, New York, v. 56, p. 911-918, 1996.

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

ELLIOTT, M.; GRIFFITHS, A. H. Contamination and effects of hydrocarbons on the Forth ecosystem. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh 93B**, Edinburgo, p. 327-392, 1987.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 285, p. 35-44, 1993.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, New York, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999.

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

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, Limerick, p. 411-4116, 2002.

FENT, K.; HUNN, J. Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). **Marine Environmental Research**, Barking, v. 42, p. 377-382, 1996.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FILIPIC, M. Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 342, p. 1-8, 1995.

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.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

GRASSI, L. E. A. Uso da técnica de micronúcleos para avaliação de genotoxicidade em peixes dos rios Jaguari e Atibaia – Bacia Hidrográfica do Rio Piracicaba – São Paulo – Brasil, In: **Hematologia, biometria, teor de compostos organoclorados e frequência de formação de micronúcleos em teleósteos de água doce, sob diferentes condições limnológicas**. 2002. 166 f. Tese (Doutorado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, 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.

GUSTAVINO, B.; DEGRASSI, F.; FILIPPONI, R.; MODESTI, D.; TANZARELLA, C.; RIZZONI, M. Mitotic indirect non-disjunction in phytohemaglutine-stimulated human lymphocytes. **Mutagenesis**, New York, v. 9, p. 17-21, 1994.

HAMOUTENE, D.; PAYNE, J. F.; RAHIMTULA, A.; LEE, K. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 54, p. 471-474, 2002.

HARRELL, R. M. Stress mitigation by use of salt and anesthetic for wild striped bass capture for brood stock. **Prog. Fish-Cult.**, v. 54, p. 228-233, 1992.

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 the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 90, p. 183-188, 1997.

HARTMANN, A., PLAPPERT, U.; RADDATZ, K.; GRÜNERT-FUCHS, M.; SPEIT, G. Does physical activity induced DNA damage? **Mutagenesis**, New York, v. 9, p. 269-272, 2001.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MacGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSCHVOLDES, M.; OLESON, F. B. Jr.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, p. 293-304, 1994.

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

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P. H.; MacGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 18, p. 277-291, 1991.

HILSDORF, A. W. S.; PETRERE JR, M. Conservação de peixes na Bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 30, n. 180, p. 62-65, 2002.

HONTELLA, A.; DUMONT, P.; DUCLOS, D.; FORTIN, R. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River, **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 14, p. 725-731, 1995.

HOOFTMAN R. N.; VINK G. J. Cytogenetic effects on the eastern mudminnow *Umbra pigmea* exposed to ethyl methanesulfonate benzo[a]pyrene and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 5, p. 261-269, 1981.

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

HOSE, J. E.; PUFFER, H.W.; OSHIDA, P.S.; BAY, S.M. Developmental and cytogenetic abnormalities induced in the purple sea urchin by environmental levels of benzo(a)pyrene, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 12, p. 319-325, 1983.

HOSE J. E.; HANNALT J. B.; PUFLER H. W.; LANDOLT M. L. Histologic and skeletal abnormalities in benzo(a)pyrene treated rainbow trout alevins. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 13, n. 1, p. 675-684, 1984.

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

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

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

IBGE. **Censo demográfico 2000**: resultados preliminares – São Paulo. Disponível em www.ibge.gov.br/censo/default.php. Acesso em: 15 mar. 2005.

INGEL, F. I.; GEVORKIAN, N. M.; ILIUSHINA, N. A.; LEITINA, B. I.; PRIKHOZHAN, L. M.; PERVERZEBA, E. L.; REVAZOBA, I. A. Prolonged psychoemotional stress as an inducer of mutations in mammals and as a modifier of mutagenesis. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 116, p. 307-309, 1993.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 498, p. 61-77, 2001.

KARR, J. R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, Bethesda, v. 6, p. 21-27, 1981.

KIRSCH-VOLDERS, M.; TALLON, I.; TANZARELLA, C.; SGURA, A.; HERMOINE, T.; PARRY, E. M.; PARRY, J. M. Mitotic non-disjunction as a mechanism for *in vitro* aneuploidy induction by X-rays in primary human cells. **Mutagenesis**, New York, v. 11, n. 4, p. 307-313, 1996.

KIRSCH-VOLDERS M.; ELHAJOUJI, A.; CUNDARI, E.; VAN-HUMMELEN, P. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 392, p. 19-30, 1997.

KIRSCH-VOLDERS M.; VANHAUWAERT A.; BOECK M. D.; DECORDIER I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, p. 137-148, 2002.

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

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

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Comm.**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KOPPEN, G.; TONCELLI, L. M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, Limerick, v. 110, n. 1-2, p. 13-24, 1999.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. **Folia biologica**, Kraków, v. 45, n. 3-4, p. 153-156, 1997.

LEACH, N. T.; JACKSON-COOK, C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 554, p. 89-94, 2004.

LERDA, D. E.; PROSPERI, C. H. Water mutagenicity and toxicology in river Tercero (Cordoba, Argentina). **Water Research**, New York, v. 30, n. 4, p. 819-824, 1995.

LUBIANCA, J. M.; OLIVEIRA, N. C. D.; LEMOS, C. T. Análise de micronúcleos e ensaio cometa em peixes (*Loricariichthys anus*) provenientes de área com influência petroquímica. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 2004, Florianópolis. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, p.146, 2004.

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.

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HIT, E. M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays

in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 198, p. 103-112, 1987.

MANNA, G. K.; BANERJEE, G.; GUPTA, S. Micronucleus test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish, *Oreochromis mossambica*. **The Nucleus**, v. 28, p. 176-179, 1985.

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

MARIANO, J. B. **Impactos Ambientais do Refino do Petróleo**. 2001. 279 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2001.

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.

MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L.; CAIRNS, J. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships and indices. **Water Research**, New York, v. 16, p. 129-139, 1982.

McNAMEE, J. P.; McLEAN, J. R. N.; FERRAROTTO, C. L.; BELLIER, P. V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 466, n. 1, p. 63-69, 2000.

METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: history and present status in Europe. **Environmental Pollution**, Barking, v. 60, p. 101-139, 1989.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000, 295 p.

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 potencial value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, p. 135-147, 1998.

MONARCA, S.; PASQUINI, R.; STORZOLINI, S. G. Mutagenicity assessment of different drinking water supplies before and after treatments. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 34, p. 815-823, 1985.

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.

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

MORAES, P. B. **Aplicação do processo eletrolítico em efluente de refinaria de petróleo e efluente simulado utilizando eletrodos de Ti/tiRuO₂ e eletrodos de ferro fundido**. 2000. 110 f. Dissertação (Mestrado em Geociências - Área de Geociências e Meio Ambiente), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000b.

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

NAKANO, T. MD.; OKA, K. MD. Transition of Ki-67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy. **Cancer**, v. 68, p. 517-523, 1991.

NEIVA, J. **Conheça o petróleo**. 4 ed. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico, 1983.

NEMEROW, N. L. **Liquid Waste of Industry: Theories, Practices and Treatment**. 1 ed. New York, Addison Wesley Publishing Company, 1971.

ODEIGAH, P. G. C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O. O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, Lund, v. 126, p. 161-167, 1997.

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

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. **Radiation Research**, Tokyo, v. 142, p. 144-152, 1995.

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.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of EROD activity and genotoxicity effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 38, p. 252-259, 1998.

PASIN, J. L. **Vale do Paraíba: ontem e hoje**. Rio de Janeiro: AC&M-Assessoria de Comunicação e Marketing, 2001.

PILOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Chemical carcinogenesis. In: KLAASEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 5 ed. New York: McGraw Hill, 1996. 201-267p.

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

PRATT, J. M.; COLER, R. A. A procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers. **Water Research**, New York, v. 10, p. 1019-1025, 1976.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. Testes com organismos superiores. In: **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira de Genética, 1991. 59p. e 75p.

RANZANI-PAIVA, M. J. **Características hematológicas associadas à biologia e parasitismo em tainha, *Mugil platanus* Günther, 1800 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP**. 1993. Dissertação (Doutorado em Ecologia) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1993.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 21-28.

RISER, S. T.; ROBERTS, A. S. **Biorremediation of petroleum contaminated sites**. Boca Raton: C.R.C. Press, 1992.

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

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 722, p. 25-254, 1999.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall, 1993.

ROWE, D. W.; SPRAGUE, J. B.; HEMING, T. A. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. I. Chronic toxicity to flagfish. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 3, p. 149-159, 1983a.

ROWE, D. W.; SPRAGUE, J. B.; HEMING, T. A.; BROWN, I. T. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. II. Growth of rainbow trout hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 3, p. 161-169, 1983b.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. R.; IZQUIERDO, J. I.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and fluctuating assymetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 412, p. 219-225, 1998.

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.

SANTOS, A. P. **Inventário Digital e Modelos Historiográficos para Arquitetura e Urbanismo**. 1999. Tese (Doutorado) – FAU/USP. Universidade de São Paulo, São Paulo, 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.

SAUNDERS, W. S.; SHUSTER, M.; HUANG, X.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PETERSEN, I.; GOLLIN, S.M. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells, **PNAS**, v. 97, p. 303-308, 2000.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTAYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental Molecular Mutagenesis**, New York, v. 38, p. 38-45, 2001.

SCHIRMER, K.; DIXON, D. G.; GREENBERG, B. M.; BOLS, N. C. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. **Toxicology**, Limerick, v. 127, p. 129-141, 1998.

SCHIRMER, K.; TOM, D. J.; BOLS, N. C.; SHERRY, J. Ability of fractionated petroleum refinery effluent to elicit cyto- and photocytotoxic responses and to induce 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase activity in fish cell lines. **The Science of Total Environment**, v. 271, p. 61-78, 2001.

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, 1975.

SCHROEDER, T. M. Investigation of bone marrow smears. In: VOGEL, F.; RÖHRBORN, G. **Chemical mutagenesis in mammals and man**. Freiburg: Springer, 1970, p. 214-219.

SETZER, J. **Atlas climático e ecológico do Estado de São Paulo**. São Paulo, Comissão Estadual da Bacia Paraná-Uruguai, 61 p, 1966.

SHERRY, J. P.; SCOTT, B. F.; NAGY, E.; DUTKA, B. J. Investigation of sublethal effects of some petroleum refinery effluents. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, v. 3, p. 129-137, 1994.

SHERRY, J. P.; SCOTT, B.; DUKTA, B. J. Use of various acute, sublethal and early life-stage tests to evaluate the toxicity of refinery effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 16, p. 2249-2257, 1997.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 140, p. 1307-1320, 1998.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003. Cap. 8, p. 167-170.

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.

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

STOPPER, H.; MÜLLER, S. O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 11, p. 661-667, 1997.

TABAN, I. C.; BECHMANN, R. K.; TORGRIMSEN, S.; BAUSSANT, T.; SANNI, S. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 58, p. 701-705, 2004.

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

TATES, A. D.; NEUTEBOOM, I.; HOFKER, M. DEN ENGELSE, L. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN/DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 74, p. 11, 1980.

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.

THERMAN, D. H.; SUSMAN, M. **Cromosomas humanos: Estructura, Comportamiento y Efectos**. 3 ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1996. p. 158-159.

TICE, R. R. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H.; VENITT, S. (Eds.), **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers, Oxford, p. 315-339, 1995.

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.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other anomalies in buccal smears: a field test in snuffs users. **Am. J. Epidemiol.**, v. 134, n. 8, p. 840-850, 1991.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 271, p. 69-77, 1992.

TOMA, S.; PALUMBO, R.; ROSSO, R. Results, toxicity and compliance in chemoprevention trials of head and neck cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 3, p. 63-68, 1994.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; OHTSUKA, Y.; NAKAMURA, T.; KOBAYASHI, J.; SOFUNI T. A preliminary study of the micronucleus test by acridin orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Sci. Tech.**, v. 25, n. 11, p. 235-240, 1992.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; RECH, C. M.; SATO, M. I. Z.; CLAXTON, L. D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, Oxford, v. 54, p. 1589-1597, 2004.

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.

VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D. M.; COFFEY, D. S. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. **Cell**, Cambridge, v. 22, p. 79-85, 1980.

WALKER, J. A.; BOREHAM, D. R.; UNRAU, P.; DUCAN, A. M. V. Chromosome content and ultrastructure of radiation – induced micronuclei. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 419-424, 1996.

WATANABE, T.; TAKAHASHI Y.; TAKAHASHI T.; NUKAYA, H.; TERAU, Y.; HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K. Seasonal fluctuation of mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 519, p. 187-197, 2002.

WESTLAKE, G. F.; SPRAGUE, J. B.; HINES, I. T.; BROWN, I. T. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. III. Avoidance and other locomoter responses in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 4, p. 235-245, 1983a.

WESTLAKE, G. F.; SPRAGUE, J. B.; BROWN, I. T. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. IV. Respiratory movements and coughing of rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 4, p. 317-325, 1983b.

WESTLAKE, G. F.; SPRAGUE, J. B.; ROWE, D. W. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. V. Reproduction of *Daphnia pulex* and overall evaluation. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 4, p. 327-339, 1983c.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B.; BLAISE, C. Comparing the presence, potency and potencial hazard of genotoxins extrated from a broad range of industrial effluents. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 27, p. 116-139, 1996.

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

WIECZOREK, A. **Efeito do efluente da refinaria de petróleo REPLAN/PETROBRÁS sobre a dinâmica populacional de *Daphnia similis***. 2003. 90p. (Trabalho de Conclusão de Curso- Ecologia) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

WILLIAMS, R. C.; METCALFE, C. D. Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 23, p. 193-202, 1992.

ZAGATTO, A. P.; GOLDSTEIN, G. E. Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. **Ambiente**, São Paulo: v. 5, n. 1, p. 13-20, 1991.