

---

Ciências Biológicas

---

Amanda Alfonso Batista

**EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO *in situ* POR  
NÍQUEL EM PEIXES DA ESPÉCIE *Oreochromis  
niloticus* (CICHLIDAE)**



Rio Claro  
2012

AMANDA ALFONSO BATISTA

**EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO *in situ* POR NÍQUEL EM PEIXES DA ESPÉCIE  
*Oreochromis niloticus* (CICHLIDAE)**

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carmem S. Fontanetti Christofolletti

Co-orientador: Prof<sup>ª</sup>. Cintya Aparecida Christofolletti

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2012

574.5263 Batista, Amanda Alfonso  
B333e Efeitos da contaminação in situ por níquel em peixes da espécie  
Oreochromis niloticus (CICHLIDAE) / Amanda Alfonso Batista. - Rio  
Claro : [s.n.], 2012  
50 f. : il., figs., gráfs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de  
Rio Claro

Orientador: Carmem S. Fontanetti Christofolletti

Co-Orientador: Cintya Aparecida Christofolletti

1. Ecologia aquática. 2. Mutagênese ambiental. 3. Genotoxicidade. 4.  
Mutagenicidade. 5. Teste do micronúcleo. 6. Ensaio do cometa. I. Título.

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

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
grandes e eternos exemplos de honestidade  
e superação!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Denise e Joel, e a minha irmã Juliana. Para eles eu considero impossível transcrever toda a minha gratidão. Obrigada por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, pelos conselhos, amor, união e pelas risadas juntos. Vocês ajudaram a definir o que eu sou hoje e tenho muito orgulho de ter vocês como minha família.

Agradeço ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Carmem S. Fontanetti Christofolletti pela instrução acadêmica, profissionalismo e comprometimento. Mas, acima disso, também agradeço pela paciência, compreensão, conselhos e toda a ajuda nos momentos difíceis. Também agradeço à minha co-orientadora Prof<sup>ª</sup>. Cintya Aparecida Christofolletti por tudo que me ensinou, pela disponibilidade em sempre me ajudar, pelo carinho e amizade. Tenho certeza que não poderia ter escolhido orientadoras melhores.

À todos do laboratório de Mutagênese Ambiental (Jorge, Júlia, Matraca, Cris, Jana, Bairral, Annelise, Pulga, Marcinha, Nádia, Matheus, Maria Tereza, Raquel, Laís) por compartilhar problemas, aflições, risadas, confraternizações e viagens.

À minha “meia-irmã” Larinha (Corita), que apesar de estar longe continua no meu coração e representa muito pra mim. Todos os momentos que a gente passou juntas é a melhor definição que eu encontro pra uma amizade verdadeira e que vai durar pra sempre.

Aos meus amigos rio-pretenses (Glauber, obrigada pelas longas conversas e por sempre me defender; Babi e Gabi, obrigada por sempre acreditarem em mim; Lorão, Lis, Ravena, Nathália, Ellen) que sempre perguntavam “como tão os peixes?” e sempre estiveram por perto.

Aos membros da república Makuta, anos de 2008 até meados de 2011, por sempre me receberem e me fazerem rir. Especialmente ao Pajé (Rafael), pela grande amizade e por ter cuidado de mim em inúmeras ocasiões.

Aos meus exemplos de veteranos, Dom e Coragem, com certeza os melhores veteranos que um bixo pode ter.

À experiência por participar do Centro Acadêmico da Biologia, ano de 2011, e ao nosso presidente Salsicha por terem me feito refletir e evoluir.

Aos membros da república Vacalhada (Franca, Bebel, Gulosa e Miguxo) por me acolherem; especialmente ao Franca e ao Miguxo pelos almoços, jantadas, filmes, séries, mario-

party e pela amizade, compreensão e carinho em umas das fases mais estressantes da minha graduação.

À Kity, Aline e ao Brioco, grandes amigos desde o primeiro ano. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pelas aventuras bobas, pelas risadas incontroláveis na sala TV da Kitinete, pelas noites acordados jogando war, por confiarem em andar de carro comigo quando eu tinha acabado de tirar carta. E obrigada, Kity e Aline, por terem sido minhas companheiras de repúblicas, pelas conversas pós-festa, pelas panquecas, pelas noites de “estudo”, pelas divagações, por aguentarem meus surtos de carência e por me deixarem quebrar todas as regras da república.

Ao Jorge, o cachorro mais louco do mundo, apesar dos pelos até mesmo dentro da geladeira sempre me fazia feliz e me conquistava com o olhar.

E por fim obrigada a todos da Biologia, pessoas “lyndas” e incríveis que fizeram esses 5 anos uma grande experiência de vida e que eu jamais vou esquecer.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	4
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	8
2.1. Níquel como substância tóxica .....	8
2.2. Especiação do níquel em água doce.....	9
2.3. Mecanismos de toxicidade aguda do níquel .....	10
2.4. Efeitos genotóxicos e mutagênicos do níquel .....	10
2.5. <i>Oreochromis niloticus</i> como bioindicador para o monitoramento ambiental.....	12
2.6. Teste do micronúcleo .....	14
2.7. Ensaio do cometa .....	15
3. OBJETIVOS .....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Material biológico .....	18
4.2. Níquel como substância tóxica .....	18
4.3. Bioensaios com <i>O. niloticus</i> .....	18
4.4. Metodologia .....	19
4.4.1. Teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares.....	19
4.4.2. Ensaio do Cometa .....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
5.1. Artigo .....	22
6. CONCLUSÕES .....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## RESUMO

A contaminação de rios com metais pesados vêm aumentando nas últimas décadas em resposta ao crescimento do setor industrial e seus dejetos, que frequentemente são despejados no ambiente sem que o tratamento adequado seja realizado. As implicações ambientais da contaminação dos ecossistemas naturais de água doce com níquel ainda são mal compreendidas, entretanto, a demanda global por este metal e as descargas antrópicas provenientes do setor industrial só aumentam. Embora o níquel não seja considerado altamente tóxico como outros metais, ele tem a capacidade de ser bioacumulativo e é, portanto, potencialmente perigoso para os peixes. Assim, é importante que seja desenvolvida uma compreensão mais profunda da fisiologia básica do níquel em peixes, tanto como um nutriente essencial quanto como um agente tóxico. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo a análise do potencial genotóxico e mutagênico do níquel em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Cichlidae), e a comparação das concentrações utilizadas deste metal nos bioensaios com a concentração limite, estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). A resolução 357/05 do CONAMA, para controlar e taxar os limites máximos de contaminantes na água define que o limite máximo da concentração total de níquel permitida em corpos de água doce é de 0,025 mg/L Ni. Assim, os organismos-teste foram expostos a três diferentes concentrações de cloreto de níquel diluído, sendo que, a primeira concentração foi de 0,0125 mg/L, ou seja, metade da concentração máxima definida pelo CONAMA. A segunda concentração utilizada, 0,025 mg/L é o próprio limite de concentração estabelecido pela resolução. Por fim, a terceira concentração utilizada foi de 0,050 mg/L, que consiste no dobro da concentração máxima total de níquel permitida em corpos de água doce. A exposição dos organismos-teste foi feita por 96 horas, e posteriormente, foi realizada a análise dos seus eritrócitos, utilizando o teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares e o ensaio do cometa com o objetivo de detectar possíveis alterações no DNA nuclear. As alterações nucleares mais encontradas no teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares, “notched”, “blebbled” e “lobed”, foram estatisticamente significativas nos tratamentos de 0,025 mg/L e 0,05 mg/L em relação ao controle negativo nos dois bioensaios realizados, demonstrando um potencial genotóxico do cloreto de níquel em solução. Além disso, no bioensaio de repetição, a maior concentração de NiCl<sub>2</sub> (0,05 mg/L) mostrou significância estatística no número de micronúcleos encontrados em relação ao controle negativo, indicando uma possível ação mutagênica do NiCl<sub>2</sub> em solução. Nas análises do ensaio do cometa do primeiro bioensaio, a concentração de 0,025 mg/L NiCl<sub>2</sub>

apresentou significância estatística de cometas classe 3 em relação ao grupo controle; enquanto no segundo bioensaio, os cometas de classe 3 foram estatisticamente significativos para a concentração de 0,05 mg/L de cloreto de níquel em relação ao tratamento com a menor concentração  $\text{NiCl}_2$  (0,0125 mg/L) e ao grupo controle. Assim, os resultados do ensaio do cometa também indicam um potencial genotóxico do  $\text{NiCl}_2$  em solução. De maneira geral, os resultados obtidos no teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares, bem como no do ensaio do cometa, demonstraram um potencial genotóxico do cloreto de níquel em solução, inclusive na concentração máxima de níquel permitida pelo CONAMA em corpos de água doce (0,025 mg/L). Além disso, na concentração mais alta de níquel testada (0,05 mg/L) também foi detectado um potencial mutagênico do  $\text{NiCl}_2$ , indicando o risco das descargas antrópicas do níquel no ambiente, uma vez que, este é um metal pesado bioacumulativo.

## 1. INTRODUÇÃO

O impacto das atividades antropogênicas sobre o meio ambiente merece destaque dentre os temas para discussão na comunidade científica mundial, uma vez que essas atividades têm alterado significativamente a qualidade da água, do solo e do ar. A poluição dos recursos hídricos é um problema sério e pertinente. Atualmente, é crescente a preocupação em diagnosticar e monitorar a poluição ambiental aquática, uma vez que os ecossistemas de água doce, juntamente com os estuários, fornecem os sistemas mais baratos e convenientes para descarte de efluentes (ODUM, 1988).

A intervenção humana pode ser considerada como a maior responsável pela magnitude e frequência da disposição de contaminantes, uma vez que a sua geração e utilização como subproduto de atividades industriais ocorre em escala exponencial, gerando diversos impactos em nível local e global, levando a um estresse contínuo da natureza e, conseqüentemente, a efeitos agudos ou crônicos à saúde dos ecossistemas e do homem (BRAYNER, 1998).

Nas últimas décadas, a contaminação ambiental por metais pesados tem aumentado significativamente, principalmente com o desenvolvimento da indústria moderna (STEINKELNER et al., 1998). O problema da genotoxicidade causada por tais metais tem adquirido novas dimensões com o advento da era industrial. Estes metais chegam à biosfera através do ar, da água e do solo. São capazes de causar grandes impactos na estabilidade dos ecossistemas, podendo até causar efeitos adversos aos seres humanos, uma vez que podem provocar efeitos tóxicos agudos e câncer em mamíferos, devido aos danos causados ao DNA (MINISSI; LOMBI, 1997; STEINKELNER et al., 1998; PATRA et al., 2004).

De acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB (2006), os metais pesados surgem nas águas naturais devido aos lançamentos de efluentes industriais tais como os gerados em indústrias extrativistas de metais, indústrias de tinta e pigmentos e, especialmente, às de galvanoplastia, que se espalham em grande número nas periferias das grandes cidades. Além destas, os metais pesados podem ainda estar presentes em efluentes de indústrias químicas, como as de formulação de compostos orgânicos, indústria de couro, pele e produtos similares, indústrias de ferro e aço, lavanderias e indústrias de petróleo.

A importância da preservação dos recursos hídricos tem levado a necessidade de monitorar e controlar a contaminação desses ambientes. Uma vez que, os metais pesados estão entre os contaminantes mais tóxicos e persistentes, suas fontes, transporte e destino precisam ser avaliados (CAMPOS, 2002).

Devido às baixas concentrações em que alguns poluentes são encontrados no meio ambiente, uma série de análises de genotoxicidade tem sido requerida na avaliação do potencial danoso desses químicos ambientais. Testes que avaliem a toxicidade e a genotoxicidade são indispensáveis para se verificar as reações dos organismos vivos à poluição e para indicar o possível efeito sinérgico de vários poluentes, uma vez que, análises físicas e químicas da água indicam somente a presença e a concentração de diferentes poluentes (MATSUMOTO et al., 2006). Logo, a utilização de organismos sensíveis, em ensaios de curto prazo, tais como plantas e animais aquáticos, se fazem necessários (MAJER et al., 2005). Assim sendo, o teste do micronúcleo, utilizando peixes, tem demonstrado ser uma técnica *in vivo* útil para testes de genotoxicidade e tem potencial para o monitoramento *in situ* da qualidade da água (KIM; HYUN, 2006).

Este teste detecta micronúcleos resultantes de quebras cromossômicas durante a divisão celular e/ou eventos de perda cromossômica resultantes de atrasos anafásicos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). Segundo Udroui (2006), há uma ampla utilização deste teste em sangue periférico de peixes, para estudos de exposição crônica a diferentes tipos de poluentes ambientais, com propriedades clastogênicas e aneugênicas. Por meio deste teste, utilizando eritrócitos de peixes, é possível ainda detectar a presença de irregularidades na morfologia nuclear dos eritrócitos, com mecanismos de formação ainda não esclarecidos. Entretanto, de acordo com a literatura, essas irregularidades parecem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processo de morte celular, genotoxicidade e/ou mutagenicidade (CORMAK, 1991; FENECH, 2000), sendo, portanto, complementares na análise de micronúcleos (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2007; HOSHINA et al., 2008).

Assim como o teste do micronúcleo, o ensaio do cometa é amplamente aceito pelas agências internacionais como um método padrão para avaliar danos no DNA em células individuais; tem sido usado em uma grande variedade de aplicações, incluindo o biomonitoramento humano e ambiental e estudos de genotoxicidade (COLLINS, 2004). É muito usado no campo da genética toxicológica, sendo utilizado em testes *in vitro* e *in vivo* com células de animais e plantas (FAUST et al., 2004). Diversas pesquisas têm avaliado a sensibilidade do ensaio do cometa nos estudos de monitoramento de agentes que causam danos ao DNA de organismos marinhos ou de água-doce (PANDRANGI et al., 1995; NACCI et al., 1996; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; BELPAEME et al., 1998; WILSON et al., 1998; SUMATHI et al., 2001; CHRISTOFOLETTI, 2008; FRENZILLI et al., 2009). Ainda

de acordo com Frenzilli et al. (2009), o ensaio do cometa é uma ferramenta amplamente utilizada no diagnóstico da genotoxicidade em ambientes aquáticos.

Esta técnica detecta quebras no DNA induzidas diretamente por agentes genotóxicos, assim como fragmentações no DNA, causadas pela morte celular (JALOSZYN'SKI et al., 1998) e sítios álcali-lábeis medindo-se a migração do DNA a partir de técnicas de eletroforese (SINGH et al., 1988). De acordo com Singh et al. (1988), é um método rápido e sensível para a quantificação de danos no DNA, em células individuais, induzidos por agentes genotóxicos. Tem as vantagens de ter uma aplicação relativamente fácil a qualquer tecido de interesse, detectando múltiplas classes de danos no DNA, gerando dados em nível de uma única célula (HARTMANN et al., 2003; CHRISTOFOLETTI et al., 2009).

Portanto, sendo o níquel um metal pesado de crescente importância para a indústria e, tendo em vista o aumento de resíduos contendo o metal, devido ao desenvolvimento e crescimento da produção industrial, que poderão causar a contaminação do meio ambiente, fazem-se necessários estudos que demonstrem a potencialidade de indução de danos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos pelo níquel, para que medidas cabíveis sejam executadas diante de uma possível situação de contaminação prejudicial à biota.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. O Níquel como substância tóxica**

O níquel (Ni) é um metal pesado com peso atômico de 58,71. Os componentes de interesse predominante no níquel incluem óxido de níquel (NiO), hidróxido de níquel (Ni(OH)<sub>2</sub>), sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>) e cloreto de níquel (NiCl<sub>2</sub>). Os sais de níquel de ácidos orgânicos fortes são solúveis em água, enquanto os sais de níquel de ácidos inorgânicos fracos são insolúveis. O níquel é resistente à corrosão pelo ar, água e por agentes alcalinos (VILAPLANA et al., 1991).

O Ni é o 24<sup>o</sup> metal em abundância na crosta terrestre. As fontes mais importantes de níquel são os minérios na forma de sulfeto de níquel. O processamento de minerais, assim como a produção e o uso do Ni tem causado contaminação ambiental por este metal (MCGRATH; SMITH, 1990). Segundo Moore e Ramamoorthy (1984), o principal uso do Ni é na produção de ligas, na indústria de galvanoplastia, fabricação de baterias (baterias de Ni-Cd), produtos de petróleo, pigmentos e como catalisadores. Estima-se que aproximadamente 180.000 toneladas de Ni são geradas, por ano, pela queima de combustíveis fósseis e processos industriais (IARC, 1990).

A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), concluiu em 1990, que os componentes de Ni são carcinogênicos para os seres humanos, visto que a maioria dos experimentos em animais *in vivo* e os dados de genética toxicológica *in vitro* demonstraram que as partículas de Ni insolúveis eram as mais carcinogênicas. Entretanto, os dados mais recentes de epidemiologia humana e experimental sugerem que os compostos de Ni solúveis podem representar um risco igual.

## 2.2. Especiação do níquel em água doce

Apesar do níquel poder existir em qualquer um dos estados de oxidação, é o estado +2 o predominante nos ambientes naturais (NRIAGU, 1980). De acordo com a classificação de metais de Nieboer e Richardson (1980), o níquel apresenta forte afinidade pelo oxigênio e nitrogênio e pouca afinidade com o enxofre.

Em condições de grande disponibilidade de oxigênio, o níquel apresenta-se como uma espécie aquosa livre e os hidróxidos de Fe e Mn controlam a sua especiação. Já em condições de hipóxia ou anóxia, sulfetos controlam a especiação do níquel por meio da formação de compostos insolúveis. Em águas com valores de pH correspondentes à condição típica da maioria dos sistemas aquáticos, entre 5 e 9, o cátion divalente de níquel,  $Ni^{+2}$ , é a espécie dominante quando ocorre a ausência de carbono orgânico dissolvido. Em níveis mais altos de pH, as espécies de hidróxido de níquel dominam a especiação (PYLE; COUTURE, 2011).

Como outros metais, o níquel forma complexos com o carbonato, como  $NiCO_3$ ; no entanto, ao contrário de outros metais, as espécies de carbonato de níquel não possuem tanta importância em ecossistemas naturais. A formação de espécies de carbonato por outros metais, como Cu ou Pb, libera sítios de ligação em oxihidróxidos de Mn permitindo a adsorção de Ni (RICHTER; THEIS, 1980). Conseqüentemente, embora as espécies de carbonato de níquel desempenhem papéis relativamente menores na especiação do Ni, a presença de carbonatos dissolvidos representa um importante, embora indireto, papel na especiação desse metal (GREEN-PEDERSEN et al., 1997).

Em águas doces naturais, 99% do Ni dissolvido está associado à complexos orgânicos, sendo a taxa de formação desses complexos muito lenta (XUE et al., 2001). A instabilidade desses complexos irá depender da natureza da matéria orgânica e da química do meio aquoso (MANDAL et al., 2000), de modo que, na água do mar e em menor medida na água doce, esses complexos costumam ser muito estáveis (NIMMO et al., 1989). Assim, o níquel ligado à complexos orgânicos estáveis não poderá distribuir-se a todos os ligantes disponíveis no sistema por um longo período de tempo (XUE et al., 2001).

Dessa forma, em ambientes naturais, a distribuição de níquel nunca pode realmente atingir o equilíbrio. Isso ocorre porque, após a entrada do Ni em um ecossistema aquático, este pode manter as suas especiações originais por um longo tempo, causando a interrupção da distribuição de Ni pré-existente no sistema. Além disso, o cátion divalente  $\text{Ni}^{+2}$  ao entrar em sistema ácido pode exigir longos períodos de tempo para formar complexos orgânicos. Como resultado desse desequilíbrio, o  $\text{Ni}^{+2}$ , cátion divalente mais tóxico, pode persistir em um sistema por um período muito maior do que outros metais sob às mesmas condições (PYLE; COUTURE, 2011).

### 2.3. Mecanismos de toxicidade aguda do níquel

Buhl e Hamilton (1991) classificaram o níquel como o quarto metal mais tóxico dentre oito metais testados, considerando a ordem do mais tóxico para o menos tóxico  $\text{Cd} > \text{Ag} > \text{Hg} > \text{Ni} > \text{Au} > \text{As} > \text{Se} > \text{Cr}$ , em três espécies de peixes.

A toxicidade do níquel é influenciada pela dureza da água, pH, sólidos suspensos totais, salinidade, espécies e grau de desenvolvimento dos peixes. Geralmente, a toxicidade aguda (96h  $\text{CL}_{50}$ ), ou seja, concentração letal média (a concentração de um agente tóxico requerida para matar 50% dos animais de teste após uma exposição de 96 horas) é de aproximadamente 4-14  $\text{mg L}^{-1}$  em água mole e 24-44  $\text{mg L}^{-1}$  em água dura (BIRGE; BLACK, 1980). Essas faixas de concentração de toxicidade aguda são altas, considerando faixas demarcadas por concentrações de magnitude  $\mu\text{g L}^{-1}$  exibidas por outros metais, como o Cd e Hg. Dessa forma, a toxicidade aguda do níquel é considerada relativamente baixa (PYLE; COUTURE, 2011).

Além disso, segundo Hall e Anderson (1995), o níquel é mais tóxico em água doce do que em ambientes salinos, provavelmente por causa da presença de outros cátions na água salgada, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , que competem com os íons níquel por sítios de ligação.

### 2.4. Efeitos genotóxicos e mutagênicos do níquel

Dados da genética toxicológica e molecular mostram que o  $\text{NiCl}_2$  pode, de fato, ser genotóxico e mutagênico, especialmente quando as células são expostas por longos períodos (KLEIN; COSTA, 2007). De acordo com Grimsrud (2003) análises recentes sobre a taxa de mortalidade, por câncer, em trabalhadores de refinarias de Ni mudaram as opiniões sobre o efeito carcinogênico das diferentes espécies deste metal. As espécies de Ni mais potentes na indução de câncer de pulmão, em seres humanos, parecem ser os sais solúveis em água, como o  $\text{NiCl}_2$  e o  $\text{NiSO}_4$ .

Compostos de Ni são capazes de produzir quebras de fitas simples no DNA, bem como aberrações cromossômicas e ligações cruzadas de proteína-DNA (ROBINSON et al., 1982; PATIERNO; COSTA, 1985; MISRA et al., 1993). Entretanto, foi sugerido que o Ni não está diretamente envolvido na formação de pontes cruzadas DNA-proteína, mas atua como agente catalisador desse processo através de mecanismos indiretos, que podem incluir a formação de radicais de oxigênio (KASPRZAK, 1991).

Um possível modo de ação para compostos solúveis de Ni causarem danos ao DNA é por meio da indução da formação de radicais OH (KLEIN et al., 1991). O  $\text{Ni}^{+2}$  pode ligar-se a determinados ligantes na célula, tais como o nitrogênio imidazólico da histidina e, como consequência é oxidado em  $\text{Ni}^{+3}$  por oxidantes fortes, tais como peróxido de hidrogênio e orgânicos hidroperóxidos (DATTA et al., 1992). A transformação  $\text{Ni}^{+2}/\text{Ni}^{+3}$  resulta na formação de radicais de oxigênio, o que pode levar à oxidação de bases do DNA ou aumentar a peroxidação lipídica (KLEIN et al., 1991). Desse modo, a carcinogênese pode ser induzida diretamente pelo radical OH ou através da peroxidação lipídica (SHI et al., 1998).

Estudos têm mostrado que os compostos de níquel solúveis em água, como o  $\text{NiCl}_2$ , mostraram-se mais potentes na indução de danos no DNA e de estresse oxidativo (STINSON et al., 1992; LYNN et al., 1997). Sunderman et al. (1985) relataram que o tratamento com  $\text{NiCl}_2$  induz a peroxidação lipídica. Ainda, segundo Sunderman et al. (1988), a exposição ao Ni produziu efeitos hematológicos em animais e seres humanos. Em humanos, observou-se um aumento transitório nos reticulócitos do sangue, após o consumo de água contendo  $\text{NiSO}_4$  e  $\text{NiCl}_2$ . Além disso, um estudo de Kawanishi et al. (1989) demonstrou que o  $\text{Ni}^{+2}$  reage com  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a produção de espécies reativas de oxigênio capazes de causar danos ao DNA.

A toxicidade do Ni na biota aquática varia amplamente e é influenciada por fatores como pH, oxigênio dissolvido, dentre outros fatores. Na água, o metal é tóxico para plantas em concentrações de aproximadamente  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; afeta a reprodução de crustáceos na água doce, quando atinge cerca de  $95 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Em concentrações de  $300 \mu\text{g.L}^{-1}$  pode matar larvas de moluscos marinhos e acima de  $730 \mu\text{g.L}^{-1}$  é prejudicial à reprodução de pequenos peixes de água doce (ROEKENS, 1988; MARQUES, 1993).

Muitas investigações genotóxicas *in vitro*, examinaram o efeito do Ni utilizando o ensaio do cometa. Entretanto, os estudos *in vivo* ainda são limitados e contraditórios (DANADEVIA et al., 2004). Esses mesmos autores concluíram que o  $\text{NiCl}_2$  é potencialmente genotóxico, capaz de induzir danos ao DNA dos leucócitos de camundongos e que este ensaio foi um método adequado para detectar tais danos.

Entretanto, apesar dos compostos de Ni serem comprovadamente carcinogênicos seus mecanismos de ação ainda permanecem desconhecidos. Estudos realizados com Ni<sup>+2</sup> em combinação com a luz UV demonstraram uma inibição no reparo do DNA de células de mamíferos em cultura. As possíveis razões para a inibição do reparo são mudanças estruturais do DNA ou interações diretas com enzimas de reparo, promovidas pela competição do Ni com íons metálicos essenciais, como Mg<sup>+2</sup> e Zn<sup>+2</sup>. A interferência dos compostos de Ni em processos de reparação do DNA pode ser considerada um mecanismo importante, pois torna a célula mais susceptível a um amplo espectro de danos no DNA induzidos por fatores endógenos ou exógenos (HARTWIG et al., 1994).

Segundo Kasprzak et al. (2003), o amplo espectro dos efeitos epigenéticos do Ni inclui alteração na expressão gênica resultando na hipermetilação do DNA, bem como a ativação ou silenciamento de determinados genes, além da transcrição de fatores, especialmente àqueles envolvidos na resposta celular à hipoxia. Assim, as investigações da carcinogênese causada pelo Ni devem ser destinadas ao desenvolvimento de tratamentos que possam inibir ou evitar a interação de Ni<sup>+2</sup> com moléculas alvo ou íons de metais essenciais e assim evitar adversos para a saúde do ser humano.

## **2.5. *Oreochromis niloticus* como bioindicador para o monitoramento ambiental**

Os efeitos que os metais podem causar aos organismos podem ser observados através do uso de bioindicadores, os quais são importantes no diagnóstico dos efeitos que estes elementos químicos podem causar aos sistemas biológicos (MELA, 2004).

De acordo com Albuquerque (2007), o aumento da quantidade de contaminantes no ecossistema aquático necessita do entendimento do efeito biológico de xenobiontes na biota aquática. O reflexo do comprometimento ambiental de um ecossistema aquático pode ser evidenciado utilizando peixes, devido a seu alto nível trófico e a sua grande importância na dieta alimentar do ser humano. Estas características contribuem para que os peixes sejam espécies alvo para pesquisas de avaliação de impactos no ambiente aquático e/ou avaliação de risco, em que são utilizados como marcadores biológicos. Assim, peixes são intensamente utilizados como bioindicadores em avaliações de contaminação ambiental.

A tilápia (*Oreochromis* sp) foi introduzida no Brasil, em Pentecoste (Ceará), pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), no ano de 1971, procedente da Costa do Marfim, África (CASTAGNOLLI, 1992). Por ser uma espécie rústica e precoce, é muito cultivada nas regiões nordeste, sul e sudeste.

A espécie tilápia do Nilo (*O. niloticus*) é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África (CARVALHO, 2006). Pertencente à família Cichlidae (SANTOS, 1977), apresenta coloração cinza azulada, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas (GALLI; TORLONI, 1984). A característica principal que distingue *O. niloticus* é a presença de listras verticais por todo comprimento da nadadeira caudal (COSTA-PIERCE, 2003).

É uma espécie de peixe cujo cultivo, bem como importância, vem crescendo, sendo atualmente uma das mais importantes aqüiculturas do mundo, atrás apenas da cultura de carpas e salmonídeos. Além disso, é a espécie de tilápia cultivada mais importante, representando mais de 80% da produção total de tilápias (MOUSA; MOUSA, 1999; AL-SHAMSI et al., 2006). Esta espécie, que é primariamente, porém não estritamente herbívora, teve sua cultura favorecida em virtude de características como rápido crescimento, grande resistência às condições adversas e doenças, adaptabilidade à diversos tipos de meios e ambientes, entre outros (CHARO-KARISA et al., 2006; PONCE-MARBÁN et al., 2006).

Outra característica que torna vantajosa a criação de tilápias é a capacidade do organismo de obter um ótimo desenvolvimento em grandes concentrações populacionais, característica que diminui o custo de manutenção *per capita* (PONCE-MARBÁN et al., 2006). Ainda segundo Ponce-Marbán et al. (2006), há estudos que demonstram que a tilápia possui uma grande resistência à ação de xenobióticos, podendo habitar diversos sítios possivelmente contaminados por metais pesados. Alguns trabalhos demonstraram ainda uma capacidade da tilápia em remover detritos e contaminantes orgânicos por meio de uma acumulação destes resíduos.

Segundo Girón-Pérez et al. (2007), a tilápia do Nilo é um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos. Os peixes, como um todo, são excelentes para este tipo de estudo, pois possuem a capacidade de retirar, estocar e bioacumular compostos e/ou poluentes em seus organismos (STREIT, 1998).

Al-Sabti e Metcalfe (1995) afirmaram que peixes são amplamente utilizados em avaliações ambientais, por apresentar, quando expostos a substâncias químicas perigosas, metabolismo similar aos vertebrados superiores, devido à proximidade evolutiva que possuem. Os resultados obtidos, por exemplo, em testes de teratogênese e carcinogênese, podem ser utilizados como indicativos de efeitos semelhantes para outros vertebrados, inclusive para humanos (HARSHBARGER; CLARK, 1990).

## 2.6. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo é um ensaio citogenético comumente usado em vários sistemas biológicos, para o monitoramento de genotoxicidade ambiental (MERSCH; BEAUVAIS, 1997).

Para Heddle et al. (1983), uma das técnicas mais promissoras, baratas e rápidas para a avaliação genotoxicológica é o teste do micronúcleo. Micronúcleos são pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultantes de quebras cromossômicas e/ou aneuploidia durante a divisão celular (HEDDLE et al., 1973; AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001). Durante a telófase, o envelope nuclear é formado ao redor do cromossomo inteiro ou do fragmento cromossômico perdido, que se descondensa e, gradualmente vai assumindo a morfologia de um núcleo interfásico, com exceção do tamanho, pois este é bem menor que o núcleo principal, razão pela qual é chamado de micronúcleo (FENECH, 2000).

Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é comumente utilizada para se detectar danos no material genético, resultantes da exposição a um agente mutagênico (HEDDLE et al., 1973). Logo, o teste do micronúcleo tem se mostrado uma técnica promissora *in vivo* para avaliar a mutagenicidade e a qualidade da água (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001).

Vários estudos têm mostrado que eritrócitos de peixes têm alta incidência de micronúcleos, após exposição a diversos poluentes sobre condições de campo e de laboratório (MINISSI et al., 1996; RUSSO; ROCCO, 2004; MATSUMOTO et al., 2006). Na literatura, consta que de maneira geral, para a realização do ensaio do micronúcleo, podem ser amostradas células de vários tecidos como brânquias, fígado, rim e sangue periférico.

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

O teste do micronúcleo tem sido aplicado, também com sucesso, em eritrócitos de peixes (HOSE et al., 1987; GRISOLIA; STARLING, 2001; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

Os eritrócitos de peixes são especialmente preferidos para este teste, pois sendo nucleados, os micronúcleos podem ser marcados facilmente como resultado de atividade clastôgenica dos contaminantes; assim sendo este teste pode ser considerado como um indicador bastante sensível da exposição crônica a contaminantes aquáticos (AL-SABTI; METCLAFE, 1995; LEMOS et al., 2005).

Concomitantemente ao teste do micronúcleo, outras anormalidades nucleares podem ser observadas e quantificadas. Alterações morfológicas no envoltório nuclear de eritrócitos de peixe foram descritos por Carrasco et al. (1990) como “blebbed” (núcleos que apresentam uma pequena evaginação nuclear, que parece conter cromatina), “lobed” (núcleo que apresenta uma evaginação maior que os núcleos em “blebbed”) e “notched” (núcleo que apresenta uma invaginação pronunciada) e alterações nucleares como núcleos vacuolizados (núcleo que apresenta uma região desprovida de material genético – vacúolo).

Muitos estudos observaram variações na morfologia nuclear de eritrócitos de peixes (HOSE et al., 1987; SANCHEZ-GALAN et al., 1999), que foram interpretadas por Ayllon e Garcia-Vasquez (2000) como lesões nucleares análogas aos micronúcleos. Alguns autores afirmam que essas anormalidades são induzidas por compostos genotóxicos (METCALFE, 1988; AYLLON; GARCIA-VASQUEZ; 2000). Contudo, ainda não é totalmente esclarecido o mecanismo de formação dessas alterações nucleares. Entretanto, mesmo assim, estudos indicam que as anormalidades nucleares são induzidas em resposta a exposição a contaminantes (PALHARES; GRISOLIA, 2002).

## 2.7. Ensaio do Cometa

Östling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver uma técnica de eletroforese em gel para detectar danos no DNA em células únicas, o teste do cometa, que também é conhecido como SCGE (*single cell gel electrophoresis*). Essa técnica micro-eletroforética permite a visualização direta de danos no DNA em células individuais, possibilitando assim a análise do comportamento do DNA em cada célula e sua organização dentro de cada nucleóide.

O ensaio do cometa é um teste utilizado com eficiência no biomonitoramento ambiental. Permite a avaliação de danos em células em proliferação ou não, *in vivo* ou *in vitro*, além de ser um método de estudo genotoxicológico sensível (MONTEITH; VANSTONE, 1995). Este ensaio combina a simplicidade de técnicas bioquímicas para detecção de quebras de fita simples de DNA e/ou sítios álcali-lábeis com as abordagens

típicas dos ensaios citogenéticos em células (HARTMANN; SPEIT, 1997; SOUZA et al., 2006).

O princípio básico do teste do cometa é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (HARTMANN et al., 2003). Dessa forma, quanto maior a cauda do cometa maior foi o dano genético induzido no nucleóide. Portanto, o ensaio do cometa é capaz de detectar quebras no material genético das células (SINGH et al., 1988), entretanto, essas lesões são consideradas primárias e, dessa forma, são passíveis de reparo. Assim, podem ou não resultar em alterações genéticas (COLLINS et al., 1997).

A análise do ensaio do cometa pode ser realizada visualmente ou por meio do uso de programas específicos. Visualmente, as células podem ser classificadas de acordo com a categoria de migração da cauda em quatro classes (0, 1, 2 e 3), sendo que a classe 0 representa nenhum ou mínimo dano e a classe 3 representa máximo dano. É classificado em classe 0 quando não há migração de fragmentos de material genético (cauda); em classe 1, quando o tamanho da cauda do cometa não excede o diâmetro da cabeça; em 2 quando o tamanho da cauda é entre um a duas vezes o tamanho da cabeça e em classe 3, quando o tamanho da cauda é maior que duas vezes o tamanho da cabeça (COLLINS et al., 1997).

É considerado um teste sensível, rápido e eficiente. Quando comparado com outros testes de genotoxicidade, as vantagens do ensaio do cometa consistem no requerimento de pequeno número de células para a detecção de pequenos danos no DNA, flexibilidade, precisão, fácil aplicação, reprodutibilidade e curto período de tempo para a realização do experimento (BELPAEME et al., 1998; TICE et al., 2000; BÜCKER et al., 2006).

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). Dessa forma, o ensaio do cometa tem sido aplicado com sucesso em eritrócitos de várias espécies de peixes para a avaliação da poluição ambiental, destacando, assim, a sensibilidade das células sanguíneas destes animais aos efeitos genotóxicos (PADRANGI et al., 1995; NACCI et al., 1996; BELPAEME et al., 1998; GONTIJO et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2007; VENTURA et al., 2008).

Mitchemore e Chipman (1998) listaram uma série de estudos desenvolvidos utilizando o ensaio do cometa, em diferentes organismos aquáticos. Neste trabalho, os autores discutiram

as vantagens e desvantagens da utilização deste ensaio, comparando-o com outras técnicas para detecção de quebras na fita de DNA, além de discutirem a aplicabilidade do ensaio em estudos de monitoramento ambiental.

Segundo Lee e Steinert (2003), o ensaio do cometa foi considerado um teste eficiente para a avaliação de danos no DNA promovidos por contaminantes ambientais, tanto em peixes marinhos como dulcícolas.

Souza e Fontanetti (2007) através do ensaio, utilizando *O. niloticus* como organismo teste, constataram comprometimento da água em locais de despejo de efluentes de uma refinaria de petróleo no rio Paraíba do Sul.

Maschio (2009) em um estudo para avaliar o possível potencial mutagênico e genotóxico dos químicos contidos nos efluentes domésticos e urbanos despejados ao longo do rio Preto, utilizando *O. niloticus* como organismo teste para a detecção de danos genotóxicos e mutagênicos, descreveu o ensaio do cometa e o teste de anormalidades nucleares e micronúcleos como os mais sensíveis aos poluentes de amostras de água do rio.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo geral do projeto foi avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do níquel em eritrócitos de tilápias (*Oreochromis niloticus*).

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o potencial genotóxico do cloreto de níquel por meio do ensaio do cometa e pela presença de anormalidades nucleares em eritrócitos de tilápias, pelo teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares;
- Avaliar o potencial mutagênico do cloreto de níquel pela presença de eritrócitos micronucleados em tilápias, pelo teste do micronúcleo.
- Comparar as concentrações utilizadas do sal  $\text{NiCl}_2$ , com a concentração limite de níquel em corpos d'água doce, estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Este projeto foi aprovado pelo “Comitê de Ética de Uso Animal” do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Rio Claro, protocolo nº 4930 de 03.08.10.

#### 4.1. Material biológico

A espécie de peixe *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente por tilápia do Nilo, foi utilizada neste trabalho como organismo teste. Foram utilizados cinco espécimes em cada bioensaio, num total de 20 indivíduos, com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Departamento de Biologia, UNESP – campus de Rio Claro, onde foram aclimatados em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistemas de filtragem e aeração.

#### 4.2. Níquel como substância tóxica

O tóxico que foi utilizado é caracterizado como metal pesado. Para a montagem dos bioensaios foi utilizado o cloreto de níquel hexahidratado PA, da marca Synth, CAS number C.1055.01.AF e peso molecular 237,70.

No Brasil é utilizada a resolução do CONAMA, nº 357 de 25 de março de 2005, para controlar e taxar os limites máximos de contaminantes. Segundo essa resolução, o limite máximo da concentração total de níquel permitida em corpos de água doce é de 0,025 mg/L Ni.

Assim, foram utilizadas três concentrações do sal cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) nos bioensaios com tilápias. A primeira de 0,0125 mg/L, ou seja, metade da concentração máxima definida pelo CONAMA. A segunda concentração utilizada, 0,025 mg/L é o próprio limite de concentração estabelecido pela resolução. A terceira concentração é 0,050 mg/L, que consiste no dobro da concentração máxima total de níquel permitida em corpos de água doce.

#### 4.3. Bioensaios com *O. niloticus*

Para os bioensaios foram utilizados quatro aquários, com capacidade de 40 L cada. Em um deles, foi realizado o controle negativo, com 30 litros de água de poço artesiano. Os três aquários restantes receberam 30 litros de água cada um e, respectivamente, três concentrações do sal  $\text{NiCl}_2$ : a primeira foi 0,0125 mg/L, a segunda concentração utilizada foi 0,025 mg/L e a terceira concentração foi 0,050 mg/L, baseadas na resolução do CONAMA para taxar o limite máximo de níquel em corpos d'água doce.

Os aquários receberam aeração por 48 horas. Após esse período, cinco peixes foram colocados aleatoriamente em cada aquário, após aclimatação, onde permaneceram por 96 horas, a fim de que fossem estimados os efeitos do  $\text{NiCl}_2$ .

#### 4.4. Metodologia

##### 4.4.1. Teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares com eritrócitos circulantes

Na confecção das lâminas para o teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares, foi retirado aproximadamente 0,3 cm<sup>3</sup> de sangue, de cada peixe vivo, por meio de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas. Após a punção, a agulha foi limpa com papel absorvente, a fim de se evitar a contaminação do sangue com líquido corporal e/ou muco. A primeira gota de sangue foi descartada, também para evitar a contaminação do sangue, sendo utilizadas as gotas posteriores para a confecção das lâminas, por meio da técnica de esfregaço sanguíneo (extensões sanguíneas).

Três extensões sanguíneas foram realizadas para cada indivíduo. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e secas à temperatura ambiente. Para a coloração do material, as lâminas foram submetidas à reação de Feulgen, com uma hidrólise ácida (HCl 1 N) de 11 minutos, em banho-maria, à 60°C (MELLO; VIDAL, 1978), e posteriormente colocadas em cubetas de vidro com reativo de Schiff durante 2 horas. Logo após, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

Para cada peixe foram analisados 3.000 eritrócitos, sob objetiva de imersão, para a determinação da frequência de células micronucleadas. Eritrócitos portadores de micronúcleos foram contabilizados para a avaliação do potencial mutagênico. Para a identificação de micronúcleos, alguns critérios foram adotados, segundo Huber et al. (1983): boa preservação e coloração do citoplasma e do núcleo; micronúcleo e o núcleo principal dentro do mesmo citoplasma; ausência de conexão entre núcleo e micronúcleo; o diâmetro máximo do micronúcleo não deve ultrapassar a metade do núcleo (se for maior, a célula será considerada como binucleada); manutenção da esfericidade do núcleo e micronúcleo.

Na avaliação do potencial genotóxico, foram consideradas os eritrócitos portadores de anormalidades nucleares, segundo a classificação de Carrasco et al. (1990) como: “blebbed nuclei”, que corresponde a uma evaginação relativamente pequena do envoltório nuclear, o qual aparenta conter eucromatina ou, algumas vezes, heterocromatina; “lobed nuclei”, correspondendo a núcleos com evaginações maiores que os “blebbeds”, mas sem a mesma delimitação. Alterações morfológicas do núcleo foram incluídas nesta categoria, por exemplo, aumento da superfície nuclear, formando múltiplos lóbulos, caracterizando um núcleo disforme; “notched nuclei”, descrito como uma invaginação da membrana. Ainda de acordo com este autor, núcleos “notched” parecem não conter material nuclear no local invaginado.

Para o teste estatístico foi utilizado uma comparação dos resultados de cada grupo de tratamento, por meio do teste de Kruskal-Wallis.

#### **4.4.2. Ensaio do Cometa utilizando sangue periférico**

Para o ensaio do cometa, a metodologia utilizada foi a técnica alcalina, baseada em Singh et al. (1988) e Christofolletti et al. (2009). A princípio, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal (ponto de fusão normal) 1,5% à 60°C, e posteriormente secas e armazenadas. Após a punção cardíaca, com seringas devidamente heparinizadas, uma amostra de 5 µL do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µL de PBS. As lâminas pré-gelatinizadas foram montadas com 10 µL da suspensão celular + 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) à 37°C. Foi adicionada uma lamínula sobre cada lâmina, levando-as à geladeira, por 20 minutos, para solidificação do gel. Decorrido este tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mantidas em solução de lise gelada e recém-preparada (1 mL de triton X-100, 20 mL de DMSO e 79 mL de solução de lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10,0-10,5), em geladeira, por no mínimo uma hora, protegidas da luz.

A solução de lise possui propriedades detergentes e contem 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 em um banho de gelo e a corrida de eletroforese foi realizada com voltagem constante (25V) e amperagem de 280-300 mA, por 20 minutos. Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e a desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA. As lâminas foram, então, neutralizadas com tampão (Tris-HCl 0,4M, 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. Toda a metodologia acima foi realizada na ausência de luz.

As lâminas ficaram acondicionadas à temperatura ambiente para a secagem e estocadas a seguir. A coloração foi realizada com Gel Red no momento da análise.

Para cada peixe foram analisados aleatoriamente 100 nucleóides, num total de 500 por tratamento, mais o controle. Para a análise, foi utilizado microscópio de fluorescência, filtro B-3<sup>4</sup> (excitação:  $\lambda = 420-490$  nm, barreira:  $\lambda = 520$  nm), em objetiva de 40x.

Para a quantificação de migração e a análise de distribuição dos cometas, dois parâmetros de genotoxicidade foram utilizados: classificação visual dos cometas/nucleóides e escore do dano (RIGONATO et al., 2005).

De acordo com a migração dos fragmentos de DNA, a classificação dos nucleóides dar-se-á:

- Classe 0: nenhum dano aparente, ou seja, nucleóides que não apresentam 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 e 3). Logo, os escores podem variar de zero (todas as células sem dano – 0x100) a 300 (todas as células com dano máximo – 3x100). Os nucleóides totalmente fragmentados não foram considerados, pois representam células em processo de morte celular (HARTMANN; SPEIT, 1997).

Os resultados foram apresentados como frequência de células com dano, distribuição de classes e o escore de dano. A análise estatística foi realizada pelo método de Kruskal-Wallis, com  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados serão apresentados na forma de um artigo científico que será submetido à uma revista especializada da área.

**- ARTIGO: Genotoxic and mutagenic effects of nickel in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Cichlidae)**

**ARTIGO****Genotoxic and mutagenic effects of NiCl<sub>2</sub> in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*  
(Cichlidae)****Efeitos genotóxicos e mutagênicos do NiCl<sub>2</sub> em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*  
(Cichlidae)**

Amanda Alfonso Batista<sup>1</sup>, Cintya Aparecida Christofolletti<sup>2</sup>, Carmem S. Fontanetti<sup>3</sup>

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.

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

1: amandaalfonso@hotmail.com; 2: cinyachris@gmail.com; 3: fontanet@rc.unesp.br

**RESUMO**

As implicações ambientais da contaminação dos ecossistemas naturais de água doce com níquel ainda são mal compreendidas, entretanto, a demanda global por este metal e as descargas antrópicas provenientes do setor industrial em corpos d'água só aumentam. O níquel é um metal bioacumulativo e, portanto, tem a capacidade de se perpetuar através da cadeia trófica podendo causar danos aos peixes e a outros organismos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do metal pesado níquel, em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). Foram testadas três concentrações de cloreto níquel diluído: 0,0125 mg/L, 0,025 mg/L e 0,05 mg/L, sendo 0,025 mg/L a concentração limite de níquel permitida para corpos d'água doce pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), legislação vigente no Brasil. A exposição dos organismos-teste foi feita por 96 horas, e posteriormente, foi realizado o teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares e o ensaio do cometa com o objetivo de detectar possíveis alterações no DNA nuclear dos eritrócitos. As três concentrações de NiCl<sub>2</sub> testadas foram capazes de induzir danos genotóxicos nos eritrócitos de *O. niloticus* e, a maior concentração testada, também apresentou potencial mutagênico.

**Palavras-chave:** tilápia, teste do micronúcleo, ensaio do cometa.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB (2006), os metais pesados surgem nas águas naturais devido aos lançamentos de efluentes industriais tais como os gerados em indústrias extrativistas de metais, indústrias de tinta e pigmentos e, especialmente, as de galvanoplastia. Estima-se que aproximadamente 180.000 toneladas de Ni são geradas, por ano, pela queima de combustíveis fósseis e processos industriais (IARC, 1990). Ainda segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (1990), os componentes do Ni podem ser carcinogênicos para os seres humanos.

A importância da preservação dos recursos hídricos tem levado a necessidade de monitorar e controlar a contaminação desses ambientes. Uma vez que, os metais pesados estão entre os contaminantes mais tóxicos e persistentes, suas fontes, transporte e destino precisam ser avaliados (CAMPOS, 2002). Assim, testes que avaliem a toxicidade e a genotoxicidade são indispensáveis para se verificar as reações dos organismos vivos à poluição, uma vez que, análises físicas e químicas da água indicam somente a presença e a concentração de diferentes poluentes (MATSUMOTO et al., 2006). Logo, ensaios de curto prazo, com a utilização de organismos sensíveis, fazem-se necessários (MAJER et al., 2005). Segundo Girón- Pérez et al. (2007), a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) é um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos. Os peixes, como um todo, são excelentes para este tipo de estudo, pois possuem a capacidade de retirar, estocar e bioacumular compostos e/ou poluentes em seus organismos (STREIT, 1998).

O teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares em peixes tem demonstrado ser uma técnica *in vivo* útil para testes de mutagenicidade e, tem potencial para o monitoramento *in situ* da qualidade da água (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006; KIM; HYUN, 2006; HOSHINA et al., 2008). Este teste detecta micronúcleos resultantes de quebras cromossômicas durante a divisão celular e/ou eventos de perda cromossômica resultantes de atrasos anafásicos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Assim como o teste do micronúcleo, o ensaio do cometa é amplamente aceito pelas agências internacionais como um método padrão para avaliar danos no DNA em células individuais. Esta técnica detecta quebras no DNA induzidas diretamente por agentes genotóxicos, assim como fragmentações no DNA, causadas pela morte celular (JALOSZYN'SKI et al., 1998) e sítios álcali-lábeis medindo-se a migração do DNA a partir de técnicas de eletroforese (SINGH et al., 1988). Tem as vantagens de ter uma aplicação

relativamente fácil a qualquer tecido de interesse, detectando múltiplas classes de danos no DNA, gerando dados em nível de uma única célula (HARTMANN et al., 2003; CHRISTOFOLETTI et al., 2009). Diversas pesquisas têm avaliado a sensibilidade do ensaio do cometa nos estudos de monitoramento de agentes que causam danos ao DNA de organismos marinhos ou de água-doce (PANDRANGI et al., 1995; NACCI et al., 1996; BELPAEME et al., 1998; WILSON et al., 1998; SUMATHI et al., 2001; CHRISTOFOLETTI, 2008; FRENZILLI et al., 2009).

Portanto, sendo o níquel um metal pesado de crescente importância para a indústria e, tendo em vista o aumento de resíduos contendo o metal, devido ao desenvolvimento e crescimento da produção industrial, que poderão causar a contaminação do meio ambiente, fazem-se necessários estudos que demonstrem a potencialidade de indução de danos genotóxicos e mutagênicos pelo níquel, para que medidas cabíveis sejam executadas diante de uma possível situação de contaminação prejudicial à biota. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade e a mutagenicidade de um sal de níquel, o  $\text{NiCl}_2$ , em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* através do teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares e do ensaio do cometa e, comparar as concentrações de cloreto de níquel utilizadas com a concentração limite de níquel permitida em corpos d'água doce pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Material biológico**

A espécie de peixe *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae), conhecida popularmente por tilápia do Nilo, foi utilizada como organismo teste. Foram utilizados cinco espécimens em cada bioensaio, num total de 20 indivíduos, com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Os espécimes, oriundos de piscicultura, foram trazidos ao Departamento de Biologia, UNESP – campus de Rio Claro, onde foram aclimatados em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistemas de filtragem e aeração. Este estudo foi aprovado pelo “Comitê de Ética de Uso Animal” do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Rio Claro, protocolo nº 4930 de 03.08.10.

### **Composto testado**

Para a montagem dos bioensaios foi utilizado o cloreto de níquel hexahidratado PA, da marca Synth, CAS number C.1055.01. AF e peso molecular 237,70.

Segundo a resolução do CONAMA, nº 357 de 25 de março de 2005, o limite máximo da concentração total de níquel permitida em corpos de água doce é de 0,025 mg/L Ni. Assim, as tilápias foram expostas a três concentrações de cloreto de níquel. A primeira de 0,0125 mg/L, metade da concentração máxima definida pelo CONAMA. A segunda concentração utilizada, 0,025 mg/L corresponde ao próprio limite de concentração estabelecido pela resolução. Por fim, a terceira concentração foi de 0,050 mg/L, que consiste no dobro da concentração máxima total de níquel permitida em corpos de água doce.

### **Bioensaios**

Para os bioensaios foram utilizados quatro aquários, com capacidade de 40 L cada. Em um deles, foi realizado o controle negativo, com 30 litros de água de poço artesiano. Os três aquários restantes receberam 30 litros de água cada um e, as três concentrações do sal  $\text{NiCl}_2$  descritas acima.

Os aquários receberam aeração por 48 horas. Após esse período, cinco peixes foram colocados aleatoriamente em cada aquário, após aclimatação, onde permaneceram por 96 horas, a fim de que fossem estimados os efeitos do  $\text{NiCl}_2$ .

### **Teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares**

Aproximadamente 0,3 cm<sup>3</sup> de sangue foram retirados de cada peixe vivo, por meio de punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas. Foram então confeccionadas três lâminas por indivíduo, por meio da técnica de esfregaço sanguíneo (extensões sanguíneas). As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e, após 24 horas, foram hidrosiladas em HCl 1 N por 11 minutos, em banho-maria, à 60°C (MELLO; VIDAL, 1978). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e colocadas em cubetas de vidro com reativo de Schiff durante 2 horas.

Para cada peixe foram analisados 3.000 eritrócitos, sob objetiva de imersão (1000x). Eritrócitos portadores de micronúcleos foram contabilizados para a avaliação do potencial mutagênico. Na avaliação do potencial genotóxico, foram consideradas as eritrócitos com anormalidades nucleares, como “blebbed nuclei”, “lobed nuclei”, “notched nuclei” e “broken-egg” segundo a classificação de Carrasco et al. (1990). Foi realizada uma comparação dos

valores de média e desvio padrão dos resultados de cada grupo de tratamento, por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis.

### **Ensaio do Cometa**

O ensaio do cometa foi realizado seguindo a metodologia da técnica alcalina, baseada em Singh et al. (1988) e Christofolletti et al. (2009). A princípio, as lâminas foram mergulhadas em agarose normal 1,5% à 60°C, e posteriormente secas e armazenadas. Após a punção cardíaca, uma amostra de 5 µL do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µL de PBS. As lâminas pré-gelatinizadas foram montadas com 10 µL da suspensão celular + 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) à 37°C. Foi adicionada uma lamínula sobre cada lâmina, levando-as à geladeira, por 20 minutos, para solidificação do gel. Decorrido este tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mantidas em solução de lise gelada e recém-preparada (1 mL de triton X-100, 20 mL de DMSO e 79 mL de solução de lise estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10,0-10,5), em geladeira, por no mínimo uma hora. 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 em um banho de gelo e a corrida de eletroforese foi realizada com voltagem constante (25V) e amperagem de 280-300 mA, por 20 minutos. As lâminas foram, então, neutralizadas com tampão (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol 100%, por 10 minutos. Toda a metodologia acima foi realizada na ausência de luz. A coloração foi realizada com Gel Red no momento da análise.

Para cada peixe foram analisados aleatoriamente 100 nucleóides, num total de 500 por tratamento, mais o controle. Para a análise, foi utilizado microscópio de fluorescência, filtro B-3<sup>4</sup> (excitação:  $\lambda=420-490$  nm, barreira:  $\lambda=520$  nm), em objetiva de 40x. Para a quantificação de migração e a análise de distribuição dos cometas foi realizada a classificação visual dos cometas/nucleóides e calculado o escore do dano (RIGONATO et al., 2005). Foi realizada uma comparação dos valores de média e desvio padrão dos resultados de cada grupo de tratamento, por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis.

## **RESULTADOS**

### **Teste do micronúcleo**

Os resultados da avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica, dos dois bioensaios estão apresentados na forma de média e desvio padrão nas tabelas 1 e 2.

A análise dos resultados do teste do micronúcleo, aplicado em eritrócitos de *O. niloticus* (Figura 1A), expostos às diferentes concentrações de cloreto níquel, revelaram o potencial genotóxico e mutagênico deste metal.

Foram encontrados valores estatisticamente significativos, para núcleos do tipo “notched” (Tabelas 1 e 2, Figura 1B) para as concentrações de 0,025 mg/L e 0,05 mg/L de ambos os bioensaios. Núcleos “lobed” (Tabelas 1 e 2, Figura 1C) foram estatisticamente significativos, com  $p < 0,05$ , para a concentração de 0,0125 mg/L e, com  $p < 0,01$ , para as concentrações de 0,025 mg/L e 0,05 mg/L para ambos os bioensaios. Núcleos tipo “blebbed” (Tabelas 1 e 2, Figura 1D) foram estatisticamente significativos, com  $p < 0,05$ , para a concentração de 0,0125 mg/L de ambos os bioensaios; já a concentração de 0,025 mg/L foi estatisticamente significativa, com  $p < 0,01$ , no primeiro bioensaio e, com  $p < 0,05$ , no segundo bioensaio, enquanto a concentração de 0,05 mg/L foi estatisticamente significativa com  $p < 0,05$  no primeiro bioensaio e com  $p < 0,01$  no segundo bioensaio. A alteração nuclear tipo “broken-egg” (Tabelas 1 e 2, Figura 1E) não foi estatisticamente significativa em nenhum dos bioensaios realizados. As somatórias das anormalidades mostraram-se significativas, com  $p < 0,05$ , na concentração de 0,0125 mg/L no primeiro bioensaio e na concentração de 0,025 mg/L no segundo bioensaio e, com  $p < 0,01$ , para as concentrações de 0,025 mg/L e 0,05 mg/L no primeiro bioensaio e para a concentração de 0,05 mg/L no bioensaio de repetição.

Eritrócitos micronucleados (Tabela 2, Figura 1F) foram estatisticamente significativos na concentração mais alta de cloreto níquel testada, 0,05 mg/L, no segundo bioensaio realizado.

**Tabela 1** – Valores de média e desvio padrão de micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos ao cloreto de níquel durante o primeiro bioensaio realizado.

Tratamento	MN	Notched	Blebbbed	Lobed	Broken-egg	Somatória das anormalidades
CN	0.6±0.54	20.2±7.46	13±6.89	3.2±1.48	0.4±0.89	36.8±13.97
N1	0.8±0.83	23.2±9.39	37±17.39*	10.8±4.81*	0.6±0.54	71.6±30.63*
N2	1.4±1.14	42.6±15.88*	37.6±11.17**	21.2±8.49**	0.8±0.83	102,2±32.15**
N3	0.8±0.83	36.4±14.13*	50.8±24.69*	22.4±7.79**	0.4±0.54	110±44.18**

MN: micronúcleo; CN: controle negativo; N1: concentração de 0,0125 mg/L , de cloreto de níquel; N2: concentração de 0,025 mg/L, de cloreto de níquel; N3: concentração de 0,05 mg/L, de cloreto de níquel.

\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ .

\*\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,01$ .

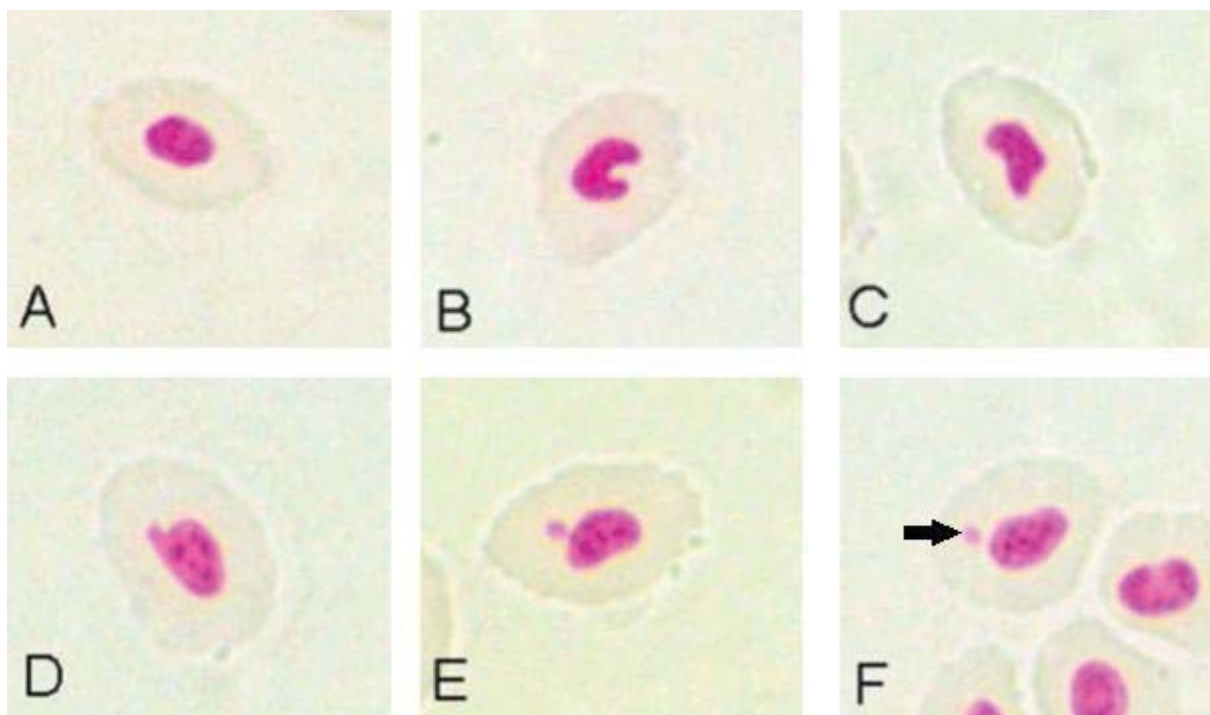
**Tabela 2** – Valores de média e desvio padrão de micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos ao cloreto de níquel durante o segundo bioensaio realizado.

Tratamento	MN	Notched	Blebbbed	Lobed	Broken-egg	Somatória das anormalidades
CN	0.40±0.54	16.80±10.08	10.80±6.30	2.40±1.14	0.20±0.44	30.60±15.35
N1	0.60±0.54	17.60±7.19	28.40±14.43*	6±2.54*	0.4±0.54	51±25.50
N2	0.80±0.83	33.60±13.86*	28.80±10.66*	14.20±6.53**	0.60±0.54	77.60±28.63*
N3	1.20±0.44*	33.80±12.91*	44±16.27**	19.80±6.83**	0.40±0.54	99±32.46**

MN: micronúcleo; CN: controle negativo; N1: concentração de 0,0125 mg/L , de cloreto de níquel; N2: concentração de 0,025 mg/L, de cloreto de níquel; N3: concentração de 0,05 mg/L, de cloreto de níquel.

\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,05$ .

\*\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Mann-Whitney, com  $p < 0,01$ .



**Figura 1:** Eritrócitos de *O. niloticus* expostos à cloreto de níquel. **A.** Eritrócito normal; **B.** Eritrócito com alteração “notched”; **C.** Eritrócito com alteração “lobed”; **D.** Eritrócito com alteração “blebbed”; **E.** Eritrócito com alteração “broken-egg”; **F.** Eritrócito com micronúcleo (seta).

### Ensaio do Cometa

Os resultados obtidos nos dois bioensaios estão apresentados na forma de média e desvio padrão nas tabelas 3 e 4.

A análise dos resultados do ensaio do cometa, igualmente aplicado em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos às diferentes concentrações de cloreto de níquel, revelaram o potencial genotóxico deste metal, para ambos os bioensaios.

A frequência de nucleóides em cada classe de migração e o escore do dano foram utilizados como parâmetros para a avaliação da genotoxicidade. Para esta avaliação foram observadas todas as classes de migração dos cometas (Figura 2).

No primeiro bioensaio, cometas de classe 3 (Tabela 3, Figura 2D) foram estatisticamente significativos, com  $p < 0,05$ , para a concentração de 0,025 mg/L, enquanto no bioensaio de repetição, os cometas de classe 3 (Tabela 4, Figura 2D) mostraram-se estatisticamente significativos para a concentração de 0,05 mg/L. Em ambos os bioensaios a somatória das células com cometas e o escore de dano (Tabelas 3 e 4) da concentração de 0,05 mg/L foram estatisticamente significativos, com  $p < 0,05$ . Assim, em ambos os bioensaios, observou-se que a concentração de 0,05 mg/L foi a que apresentou maior

potencial genotóxico, com base nos valores obtidos pelos nucleóides com cometa e pelo escore de dano (Tabelas 3 e 4). Além disso, no bioensaio de repetição, cometas de classe 3 (Tabela 4, Figura 2D) também foram estatisticamente significativos em relação ao tratamento com a menor concentração de cloreto de níquel, 0,0125 mg/L.

**Tabela 3** - Valores de média e desvio padrão de classe de cometas observados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos ao cloreto de níquel durante o primeiro bioensaio realizado.

Tratamento	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Com cometa	Score
CN	44±13.75	26±5.70	23.4±7.16	7.8±3.96	57.2±11.96	96.2±22.46
N1	21±7.48	28.4±7.40	26.4±4.15	25.4±17.38	80.2±8.70	157.4±40.93
N2	22.6±9.65	29.8±3.27	19.8±5.44	30.8±8.04*	80.4±10.01	161.8±30.94
N3	17.8±10.13	33.2±8.10	26.2±5.80	27±9.69	86.4±9.12*	166,6±30.93*

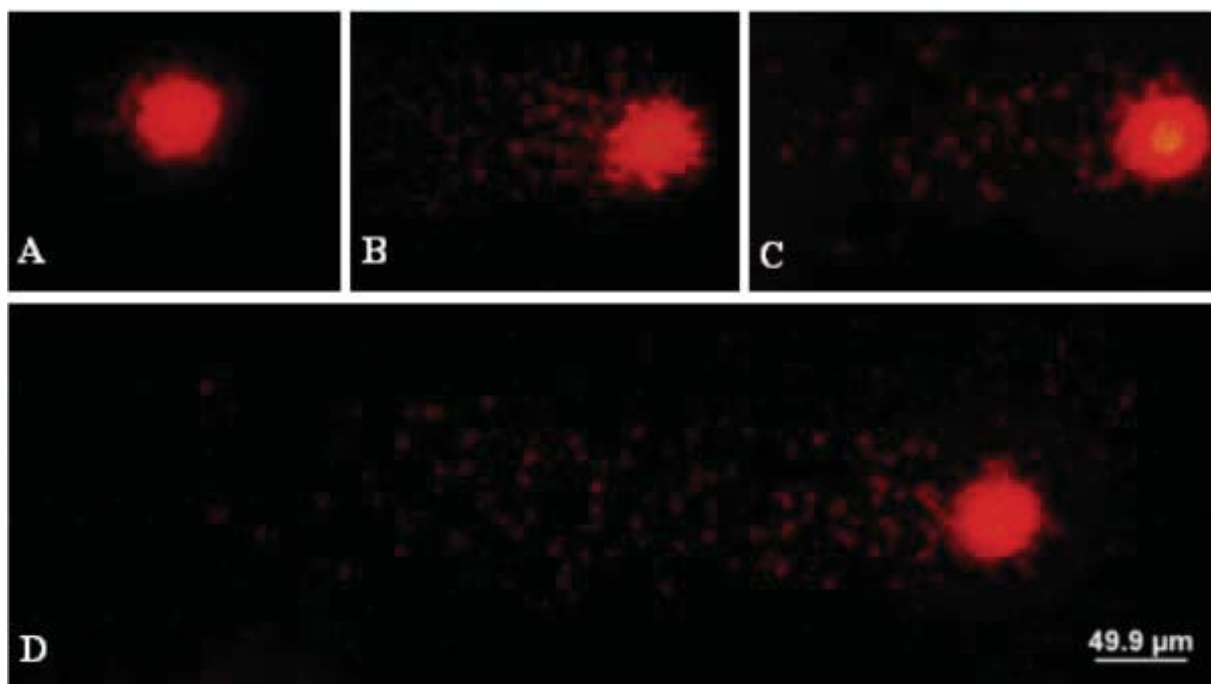
\* valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis, com  $p < 0,05$ , em relação ao CN.

**Tabela 4** - Valores de média e desvio padrão de classe de cometas observados em eritrócitos de *O. niloticus*, expostos ao cloreto de níquel durante o segundo bioensaio realizado.

Tratamento	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Com cometa	Score
CN	28.2±7.12	41.80±5.44	25.60±4.97	11±3.93	78.40±8.56	126±18.23
N1	28.80±5.63	45.40±8.08	22.40±8.26	11.80±3.70	79.60±9.86	125.60±22.77
N2	22.80±6.72	37.60±5.72	23.60±6.58	26.40±3.36	87.60±3.97	164±11.57
N3	13.60±5.02	28.20±4.43	33.60±5.45	36.40±5.31* <sup>1</sup>	98.20±7.01*	204.60±17.30*

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

<sup>1</sup> valores estatisticamente significativos, pelo método de Kruskal-Wallis, com  $p < 0,05$ , em relação ao tratamento N1.



**Figura 2:** Classes de migração de cometas em nucleóides de *O. niloticus* expostos à diferentes concentrações de cloreto de níquel. **A.** Nucleóide de classe 0 (sem dano aparente); **B.** Nucleóide de classe 1 (pouco dano); **C.** Nucleóide de classe 2 (médio dano); **D.** Nucleóide de classe 3 (máximo dano).

## DISCUSSÃO

O níquel é utilizado por muitos organismos nas atividades metabólicas e organização estrutural. É introduzido nos recursos hídricos pela descarga de efluentes domésticos e industriais, mas também pela erosão do solo e de rochas (SAWASDEE; KÖHLER, 2009). Neste sentido, é de grande importância estudos de biomonitoramento ambiental, utilizando bioindicadores e biomarcadores sensíveis e eficientes na detecção da contaminação.

Muitos estudos mostram que os sais de níquel apresentam risco e são capazes de produzir efeitos adversos e/ou carcinogenicidade em humanos e animais (COOGAN et al., 1989; SUNDERMAN, 1989; OBONE et al., 1999). Seoane e Dulout (2001) observaram que o  $\text{NiCl}_2$  aumenta a frequência de micronúcleos em fibroblastos humanos. Além disso, porcentagens significativas de micronúcleos foram encontradas na medula óssea de camundongos expostos a  $\text{NiCl}_2$  (DHIR et al., 1991). Segundo Hauptman et al. (1993), o  $\text{NiCl}_2$  pode induzir lesões oculares e malformação da retina em embriões de *Xenopus*.

Na avaliação da genotoxocidade e mutagenicidade do cloreto de níquel, por meio do teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares, a quantidade de micronúcleos encontrados no bioensaio de repetição revelaram relevância estatística na concentração mais alta (0,5 mg/L) em relação ao controle negativo. Tal resultado indica que o  $\text{NiCl}_2$  pode ser uma substância mutagênica, uma vez que, os micronúcleos surgem de fragmentos de

cromossomos ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo da célula filha por ocasião da divisão celular, o que poderia ocasionar a malformação de células durante o ciclo celular.

Além disso, alterações na morfologia nuclear dos eritrócitos de *O. niloticus* foram freqüentemente observadas em todos os tratamentos dos bioensaios realizados. Núcleos do tipo “notched”, “blebbled” e “lobed”, mostraram-se estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, nos tratamentos com as duas concentrações mais altas de cloreto de níquel testada, 0,025 mg/L e 0,05 mg/L, nos dois bioensaios realizados. Desse modo, pode-se inferir o potencial genotóxico do NiCl<sub>2</sub> em solução, em peixes da espécie *O. niloticus*.

De acordo com Grisolia (2005), essas anormalidades nucleares podem decorrer de alterações na estrutura do DNA, como quebras de fita simples ou quebras de fita dupla e da formação de adutos (ligação covalente de um elemento ou composto químico com as bases nitrogenadas do DNA), entre outros. Ainda de acordo com esse mesmo autor, uma provável causa da iniciação do câncer pode ser a formação dessas anormalidades nucleares, como resultado da interação de compostos genotóxicos com o DNA. Caso não ocorra o reparo desta lesão, esta pode ser propagada para as células filhas. Assim, estas células podem permanecer latentes por muitos anos acumulando novos danos ou ainda sofrerem uma exposição posterior a um agente promotor. Entretanto, em ambos os casos poderiam se desencadear um processo de malignização. Dessa maneira, as alterações nucleares encontradas nos tratamentos dos bioensaios realizados, são consideradas genotóxicas e podem tornar-se mutagênicas, uma vez que não sejam eficientemente reparadas; segundo Heddle et al. (1973), 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. Além disso, deve-se levar em conta que em um ambiente natural de um corpo d'água contaminado por níquel, a exposição dos organismos torna-se crônica e bioacumulativa, o que agravaria o quadro de contaminação e poderia prejudicar os mecanismos de reparo do DNA, pois, de acordo com Hartwig et al. (1994), estudos realizados com Ni<sup>+2</sup> em combinação com a luz UV demonstraram uma inibição no reparo do DNA de células de mamíferos em cultura. As possíveis razões para a inibição do reparo são mudanças estruturais do DNA ou interações diretas com enzimas de reparo, promovidas pela competição do Ni com íons metálicos essenciais, como Mg<sup>+2</sup> e Zn<sup>+2</sup>. Assim, essa possível inibição do reparo do DNA causada pelo Ni<sup>+2</sup> deixaria as células mais susceptíveis a danos no DNA causados por fatores endógenos e exógenos.

Durante a última década, o ensaio do cometa foi amplamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, sendo aplicado como metodologia de biomonitoramento ambiental, avaliação dos efeitos da radiação sobre os organismos, investigação de processos de reparo do DNA e ecotoxicologia genética.

Segundo Nanthawan et al. (2002), o ensaio do cometa é uma técnica indicada para detectar danos no DNA provocados por agentes químicos presentes no ambiente aquático. 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). A partir da análise dos dados nos dois bioensaios realizados, o ensaio do cometa demonstrou um potencial genotóxico do cloreto de níquel nas concentrações de 0,025 mg/L e 0,05 mg/L. Além disso, no segundo bioensaio realizado observou-se significância estatística dos cometas de classe 3 em relação ao tratamento com concentração de 0,0125 mg/L. Esse fato aponta para a possibilidade de que a concentração mais baixa de cloreto de níquel não cause danos significativos às células ao nível do DNA, de modo que, seu resultado seja muito parecido com o tratamento controle.

De maneira geral, o cloreto de níquel foi capaz de induzir a formação de anormalidades potencialmente genotóxicas mesmo em baixas concentrações, inclusive na concentração de 0,025 mg/L, que é o máximo da concentração total de Ni permitida em corpos de água doce no Brasil, segundo a resolução do CONAMA, no 357 de 25 de março de 2005. Além disso, também foi capaz de induzir danos potencialmente mutagênicos na maior concentração testada, 0,05 mg/L. Tais resultados mostram-se preocupantes, uma vez que, o níquel é um metal bioacumulativo e o consumo de peixes de água doce pela população humana e outros organismos da cadeia trófica é intenso.

## **AGRADECIMENTOS**

As autoras agradecem ao suporte oferecido pelo Laboratório de Mutagênese Ambiental da UNESP de Rio Claro e a FAPESP (Processo nº 2010/12391-6) e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CAMPOS, M.L.A.M.; BRENDON, A.; VIEL, F.C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle de contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, v.25, n.5, p.808, 2002.

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.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#cobre>. Acessado em: 21/11/2010.

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

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lêntico, por meio dos sistema-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências de Rio Claro, 2008.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*: a methodological comparisons. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.155-159, 2009.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 357/2005**. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf). Acessado em 03/12/2009.

COOGAN, T.P.; LATTA, D.M.; SNOW, E.T.; COSTA, M. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 19, p. 341–384, 1989.

DHIR, H.; AGARWAL, K.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Modifying role of *Phyllanthus emblica* and ascorbic acid against nickel clastogenicity in mice. **Cancer Letters**, v.59, p.9–18, 1991.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v.681, n.1, p.80-92, 2009.

GIRÓN-PÉREZ, M. I.; SANTERRE, A.; GONZALEZJAIME, F.; CASAS-SOLIS, J.; HERNANDÉZ CORONADO, M.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; TAKEMURA, A.; ZAITSEVA, G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 23, n. 4, p. 760-769, 2007.

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, p. 173-200, 2003.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução**. Editora da UNB. Brasília, p. 392, 2005.

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 45-51, January 2003.

HARTWIG, A.; KRUGER, I.; BEYERSMANN, D. Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. **Toxicology Letters**, v. 72, p.353-358, 1994.

HAUPTMAN, O.; ALBERT, D.M.; PLOWMAN, M.C.; HOPFER S.M.; SUDERMAN F.W Jr. Ocular malformations of *Xenopus laevis* exposed to nickel during embryogenesis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.23, n.6, p.397-406, 1993.

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

HOSHINA, M.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v. 656, p.44-48, 2008.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chromium, Nickel and Welding**. Lyon, v.49, p.1-691, 1990.

JALOSZYN'SKI, P.; KUJAWSKI, M.; WAŁSOWICZ, M.; SZULC, R.; SZYFTER, K. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied *in vitro* using the comet assay. **Mutation Research**, v.439, p.199-206, 1998.

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.

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

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE Jr., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLES, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v.540, p.153-163, 2003.

MAJER, B.J.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMULLER, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochimica Hydrobiologia**, v.33, p.45-55, 2005.

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

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

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

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

OBONE, E.; CHAKRABARTI, S.K.; BAI, C.; MALICK, M.A.; LAMONTAGNE, L.; SUBRAMANIAN, K.S. Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague–Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. **Journal of Toxicology Environmental Health**. v. 57, p. 379–401, 1999.

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

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

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38, p.38–45, 2001.

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**, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

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

STREIT, B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (Ed.). **Fish ecotoxicology**. Basel: Birkhauser, p. 353-387, 1998.

SEOANE, A.I.; DULOUT, F.N. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. **Mutation Research**, v.490, p.99–106, 2001.

SUMATHI, M.; KALAISELVI, K.; PALANIVEL, M.; RAJAGURU, P. Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. **Environmental Contamination Toxicology**, v.66, p.407–414, 2001.

SUNDERMAN Jr. F.W.; DINGLE, B.; HOPFER, S.M.; SWIFT, T. Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulfate and nickel chloride. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 14, p. 257–266, 1989.

SWASDEE, B.; KÖHLER, H. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). **Chemosphere**, Oxford, v.75, p.1539-1547, 2009.

WILSON, J.T.; PASCOE, P.L.; PARRY, J.M.; DIXON, D.R. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). **Mutation Research**. v. 399, p. 87–95, 1998.

## 6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pelo teste do micronúcleo e outras anormalidades em eritrócitos circulantes e pelo ensaio do cometa em peixes da espécie *O. niloticus*, expostos a três diferentes concentrações de cloreto de níquel, pode-se concluir que:

- As três concentrações de  $\text{NiCl}_2$  utilizadas apresentaram potencial genotóxico, frente às diversas anormalidades nucleares observadas.
- Os valores obtidos para eritrócitos micronucleados mostraram valores estatisticamente significativos para a maior concentração de cloreto de níquel (0,05 mg/L) testada, indicando um potencial mutagênico do  $\text{NiCl}_2$  em solução.
- O teste do micronúcleo constituiu uma metodologia eficiente na detecção dos potenciais genotóxico e mutagênico do  $\text{NiCl}_2$ .
- *Oreochromis niloticus* se mostrou um eficiente organismo teste para o biomonitoramento de recursos hídricos contaminados por metais pesados.
- O  $\text{NiCl}_2$  foi capaz de induzir a formação de anormalidades potencialmente genotóxicas na concentração de 0,025 mg/L, que é o máximo da concentração total de Ni permitida em corpos de água doce segundo a resolução do CONAMA, no 357 de 25 de março de 2005.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. **Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na avaliação do efeito da contaminação da Baía de Guanabara, RJ**. Dissertação de Mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), 2007.

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

AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A.-F. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 9, p. 447-455, 2006.

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.

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

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A. **Aquatic toxicology of nickel. In: Nickel in the Environment (J.O. Nriagu, ed.)**, p. 349–366. John Wiley & Sons, New York, 1980.

BRAYNER, F.M.M. **Determinação de taxas de retenção de metais-traço por sedimentos orgânicos em um viveiro de piscicultura em área estuarina e urbana**. São Carlos. Tese (Doutorado) – Escola de engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 1998.

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

BUHL, K. J.; HAMILTON, S. J. Relative sensitivity of early life stages of Arctic grayling, coho salmon, and rainbow trout to nine inorganics. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v. 22, p. 184–197, 1991.

CAMPOS, M.L.A.M.; BRENDO, A.; VIEL, F.C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle de contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, v.25, n.5, p.808, 2002.

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.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, p.81-86, 1992.

CARVALHO, E.D. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do Alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas. **Relatório Científico (FAPESP)**, Botucatu, SP, p. 46, 2006.

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

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#cobre>. Acessado em: 21/11/2010.

CHARO-KARISA, H.; KOMEN, H.; REZK, M. A.; PONZONI, R. W.; VAN ARENDONK, J. A. M.; BOVENHUIS, H. Heritability estimates and response to selection for growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in low-input earthen ponds. **Aquaculture**, v. 261, p. 479-486, 2006.

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lêntico, por meio dos sistema-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências de Rio Claro, 2008.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*: a methodological comparisons. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.155-159, 2009.

COOGAN, T.P.; LATTA, D.M.; SNOW, E.T.; COSTA, M. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 19, p. 341–384, 1989.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249–261, 2004.

COLLINS, A. R. *et al.* The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, Amsterdam v. 375, n. 2, p. 183-193, 1997.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 357/2005**. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf). Acessado em 03/12/2009.

CORMAK, D.H. (Ed.). **Hans Histologia**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 5, 35, 1991.

COSTA-PIERCE, B. A. Rapid evolution of the established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the need to incorporate invasion science into regulatory structures. **Biology Environmental Magazine**, v. 5, p. 71-84, 2003.

DANADEVIA, K.; ROZATIA, R.; BANUB B.S.; GROVERB, P. In vivo genotoxic effect of nickel chloride in mice leukocytes using comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.751–757, 2004.

DATTA, A.K.; MISRA, M.; NORTH, S.L.; KASPRZAK, K.S. Enhancement by nickel(II) and L-histidine of 2\_-deoxyguanine oxidation with hydrogen peroxide. **Carcinogenesis**, v.13, p.283–287, 1992.

DHIR, H.; AGARWAL, K.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Modifying role of *Phyllanthus emblica* and ascorbic acid against nickel clastogenicity in mice. **Cancer Letters**, v.59, p.9–18, 1991.

DORESWAMY, K.; SHRILATHA, B.; RAJESHKUMAR, T.; MURALIDAHARA. Nickel-induced oxidative stress in testes of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects. **Journal of Andrology**, v. 25, n.6, p.996–1003, 2004.

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S.; BOEDECKER, R.H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v.566, p.209–229, 2004.

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

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v.681, n.1, p.80-92, 2009.

GALLI, L. F.; TORLONI, C. E. C. **Criação de peixes**. Editora Nobel, 2ª edição; São Paulo, 1984.

GIRÓN-PÉREZ, M. I.; SANTERRE, A.; GONZALEZJAIME,F.; CASAS-SOLIS, J.; HERNANDÉZ CORONADO, M.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; TAKEMURA, A.; ZAITSEVA, G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 23, n. 4, p. 760-769, 2007.

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, p. 173-200, 2003.

GREEN-PEDERSEN, H.; JENSEN, B. T.; PIND, N. Nickel adsorption on MnO<sub>2</sub>, Fe(OH)<sub>3</sub>, montmorillonite, humic acid and calcite: a comparative study. **Environmental Technology**. v. 18, p. 807–815, 1997.

GRIMSRUD, T.K.; BERGE, S.R.; MARTINSEN, J.I.; ANDERSEN, A. Lung cancer incidence among Norwegian nickel-refinery workers 1953–2000. **Journal of Environmental Monitoring**, v.5, p.190–197, 2003.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução**. Editora da UNB. Brasília, p. 392, 2005.

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.

HALL, L. W.; ANDERSON, R. D. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. **Critical Review Toxicology**, v. 25, p. 281–346, 1995.

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

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

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

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HARTWIG, A.; KRUGER, I.; BEYERSMANN, D. Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. **Toxicology Letters**, v. 72, p.353-358, 1994.

HAUPTMAN, O.; ALBERT, D.M.; PLOWMAN, M.C.; HOPFER S.M.; SUDERMAN F.W Jr. Ocular malformations of *Xenopus laevis* exposed to nickel during embryogenesis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.23, n.6, p.397–406, 1993.

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.

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

HOSHINA, M.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v. 656, p.44-48, 2008.

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

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

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chromium, Nickel and Welding.** Lyon, v.49, p.1–691, 1990.

JALOSZYN'SKI, P.; KUJAWSKI, M.; WAŁSOWICZ, M.; SZULC, R.; SZYFTER, K. 1998. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. **Mutation Research**, v.439, p.199–206, 1998.

KASPRZAK, K. S.; SUNDERMAN, F. W.; SALNIKOW, K.; Nickel Carcinogenesis – Review. **Mutation Research**, v. 533, p.67-97, 2003.

KASPRZAK, K.S.; BAL, W.; KARACZYN, A.A. The role of chromatin damage in nickel-induced carcinogenesis. A review of recent developments. **Journal of Environmental Monitoring**, v.5, n.2, p.183-187, 2003.

KASPRZAK, K.S. The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. **Chemical Research Toxicology**. v. 4, p. 604–615, 1991

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.

KAWANISHI, S.; INOUE, S.; YAMANMOTO, K. Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 2231–2235, 1989.

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

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE Jr., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLES, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v.540, p.153–163, 2003.

KLEIN, C.B.; COSTA, M. Nickel. In: **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3<sup>a</sup> edição, p.743, 2007.

KLEIN, C.B.; FRENKEL, K.; COSTA, M., The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. **Chemical Research of Toxicology**, v.4, p.592–604, 1991.

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

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

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

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**; v. 57, p. 195-211, 1993.

LYNN, S.; YEW, F.H.; CHEN, K.S.; JAN, K.Y. Reactive oxygen species are involved nickel inhibition of DNA repair. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 29, p. 208–216, 1997.

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.

MACKAY, D.; CLARK, K.E. Predicting the environmental partitioning of organic contaminants and their transfer to biota. In: JONES, K. C. (Ed.). **Organic Contaminants in the Environment**. New York: Elsevier, p. 101-107, 1991.

MAJER, B.J.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMULLER, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochimica Hydrobiologia**, v.33, p.45–55, 2005.

MAIER, P.; SCHIMID, W. Ten model mutagens evaluated by micronucleus test. **Mutation Research**, v. 40, p. 325-338, 1976.

MANDAL, R.; SALAM, M.S.A.; MURIMBOH, J.; HASSAN, N.M.; CHAKRABARTI, C.L.; BACK, M.H.; GREGOIRE, D.C. Competition of Ca (II) and Mg (II) with Ni (II) for binding by a well-characterized fulvic acid in model solutions. **Environmental Science Technology**, v. 34, p. 2201-2208, 2000.

MARQUES, A.L.B.; CHIERICE, G.O. Trace nickel determination with phenyldithiocarbamate in sea water, by adsorptive stripping voltammetry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 4, n.1, p.17-19, 1993.

MASCHIO, L. R. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico, e mutagênico das águas do rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP**. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2009.

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

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 1, p.77-85, 2005.

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

McGRATH, S.P.; SMITH, S. Nickel. In: ALLOWAY, B.J. (Ed.). **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley, p.125-50, 1990.

MELA, M. 2004. **Uso de Biomarcadores na Avaliacao dos Efeitos do Metilmercurio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traira)**. Tese de Mestrado do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciencias Biologicas - Universidade Federal do Parana. p. 123, 2004.

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

MERSCH J.; BEAUVAIS M.N. The micronucleous assay in the zebra mussel, *Deissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments, **Mutation Research**. v. 383, p. 141-149, 1997.

METCALFE, C.D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*), **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**. v. 40 p. 489-495, 1988.

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

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 367, p. 245-251, 1996.

MISRA, M.; OLINSKI, R.; DIZDAROGLU, M.; KASPRZAK, K.S. Enhancement by L-histidine of nickel(II)-induced DNA-protein cross-linking and oxidative DNA base damage in the rat kidney. **Chemical Research Toxicology**. v. 6, p. 33-37, 1993.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v.339, p.135-147, 1998.

MONTEIRO, S. M. et al. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry Physiology**. v. 141. p. 375-383, 2005.

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.

MOORE, J.W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy metals in natural waters**. New York: Springer-Verlag, p. 328, 1984.

MOUSA, M. A; MOUSA, S.A. Immunocytochemical Study on the Localization and Distribution of the Somatolactin Cells in the Pituitary Gland and the Brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, p. 197-211, 1999.

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

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

NIMMO, M.; VAN DEN BERG, C.M.G.; BROWN J. The chemical speciation of dissolved nickel, cooper, vanadium and iron in Liverpool Bay, Irish Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 29, p. 57-54, 1989.

NIOBER, E.; RICHARDSON, D. H. S. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. **Environmental Pollution**. v. 1, p. 3–26, 1980.

NRIAGU, J. **Global cycle and properties of nickel. In: Nickel in the Environment (J.O. Nriagu, ed.)**, p. 1–26. John Wiley & Sons, New York, 1980.

OBONE, E.; CHAKRABARTI, S.K.; BAI, C.; MALICK, M.A.; LAMONTAGNE, L.; SUBRAMANIAN, K.S. Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague–Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. **Journal of Toxicology Environmental Health**. v. 57, p. 379–401, 1999.

ODUM, E.P. Breve descrição dos principais tipos de ecossistema natural na biosfera. **In: Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.367-369, 1988.

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

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

PALHARES D.; GRISOLIA, C.K. Comparasion between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment, **Genetic. Molecular Biology**. v. 25, p. 281-284, 2005.

PATIERNO, S.R.; COSTA, M. DNA–protein crosslinks induced by nickel compounds in intact cultured mammalian cells. **Chemical Biology Interaction**. v. 55, p. 75–91, 1985.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the

development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.52, p.199-223, 2004.

PONCE-MARBÁN, D.; HERNÁNDEZ, J. M.; GASCA-LEYVA, E. Simulating the economic viability of Nile tilapia and Australian redclaw crayfish polyculture in Yucatan, Mexico. **Aquaculture**, v. 261, p. 151-159, 2006.

PYLE, G.; COUTURE P. Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. **Fish Physiology**, v. 31, p. 253-289, 2011.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology** Washington: 2<sup>a</sup> ed., p. 665, 1985.

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

RICHTER, R. O.; THEIS, T. L. **Nickel speciation in a soil/water system. In: Nickel in the Environment (J.O. Nriagu, ed.)**, p. 189–202. John Wiley & Sons, New York, 1980.

ROBINSON, S.H.; CANTONI, O.; COSTA, M. Strand breakage and decreased molecular weight of DNA induced by specific metal compounds. **Carcinogenesis**, v. 3, p. 657–662, 1982.

ROCHA, A.A. Produtos de pesca e contaminantes químicos na água da Represa Billings, São Paulo (Brasil). **Revista Saúde Pública**, v.19, p.401-410, 1985.

ROEKENS, Z.K.; GRIELI, V.R. Analysis of Rain Water by Differential Pulse Stripping Voltammetry in Nitric Acid Medium. **Acta**, v.204, p.179-187, 1988.

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**, v.57, p.168-174, 2004.

SAHIB, I.K.A.; SAMBASIVA RAO, K.R.S.; RAMANA RAO, K.V. Effects of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mostambica* (Peters), as measured through incorporation of (14C) amino acids. **Toxicology Letters**, v. 20, p. 63-67, 1984.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p. 301-304, 1999.

SANTOS, E. **Pesca e piscicultura**. Editora Itatiaia Limitada; Belo Horizonte, 1977.

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**, v. 393, p. 133-139, 1997.

SEOANE, A.I.; DULOUT, F.N. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. **Mutation Research**, v.490, p.99–106, 2001.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatine buds are related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38, p.38–45, 2001.

SHI, X.; CASTRANOVA, V.; HALLIWELL, B.; VALLYATHAN, V. Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. B1, p.181–197, 1998.

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**, v.175, p.184-191, 1988.

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

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

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

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

STINSON, T.J.; JAW, S.; JEFFERY, E.H.; PLEWA, M.J. The relationship between nickel chloride-induced peroxidation and DNA strand breakage in rat liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.117, p.98–103, 1992.

STREIT, B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (Ed.). **Fish ecotoxicology**. Basel: Birkhauser, p. 353-387, 1998.

SUMATHI, M.; KALAISELVI, K.; PALANIVEL, M.; RAJAGURU, P. Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. **Environmental Contamination Toxicology**, v.66, p.407–414, 2001.

SUNDERMAN Jr., F.W. Mechanisms of nickel carcinogenesis. **Scandinavian Journal of work, environment and health**, v. 15, p. 1–12, 1989.

SUNDERMAN Jr., F.W.; DINGLE, B.; HOPFER, S.M.; SWIFT, T. Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulfate and nickel chloride. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 14, p. 257–266, 1988.

SUNDERMAN Jr., F.W.; MARZOUK, A.; HOPFER, S.M.; ZAHRIA, O.; REID, M.C. Increased lipid peroxidation in tissue of nickel chloride-treated rats. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 15, p. 229–236, 1985.

SWASDEE, B.; KÖHLER, H. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). **Chemosphere**, Oxford, v.75, p.1539-1547, 2009.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.201–204, 2006.

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.

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

VILAPLANA, J.; ROMAGUERA, C.; GRIMALT, F., CORNELLANA, F. New trends in the use of metals in jewelery. **Contact Dermatitis**, v.25, p.124-148, 1991.

WIDDOWS, J.; DONKIN, P. **The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture**. In: Gosling E. 2<sup>a</sup> Ed. Amsterdam: Elsevier, p.171-222, 1992.

WILSON, J.T.; PASCOE, P.L.; PARRY, J.M.; DIXON, D.R. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). **Mutation Research**. v. 399, p. 87–95, 1998.

YOKOI, K.; UTHUS, E.O.; NIELSEN, F.H. Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. **Biological Trace Element Research**, v.93, p.141-154, 2003.

XUE, H. B.; JANSEN, S.; PRASCH, A.; SIGG, L. Nickel speciation and complexation kinetics in freshwater by ligand exchange and DPCSV. **Environmental Science Technology**. v. 35, p. 539–546, 2001.