



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

VANESSA MONTEIRO

**A EXPOSIÇÃO AGUDA AO CHUMBO INDUZ DANOS NO
DNA DE VÁRIOS TECIDOS DO PEIXE *Prochilodus lineatus***

Londrina
2009

VANESSA MONTEIRO

**A EXPOSIÇÃO AGUDA AO CHUMBO INDUZ DANOS NO
DNA DE VÁRIOS TECIDOS DO PEIXE *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia

Londrina
2009

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catlogação-na-Publicação (CIP)

M775e Monteiro, Vanessa.

A exposição aguda ao chumbo induz danos no DNA de vários tecidos do peixe *Prochilodus lineatus* / Vanessa Monteiro. – Londrina, 2019.
71 f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2009.
Inclui bibliografia.

1. *Prochilodus lineatus* – Teses. 2. Peixe – Teses. 3. Intoxicação – Teses. 4. Chumbo – Toxicologia – Teses. 5. Genética molecular – Teses. I. Silvia Helena Sofia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 597.554.1

VANESSA MONTEIRO

**A EXPOSIÇÃO AGUDA AO CHUMBO INDUZ DANOS NO
DNA DE VÁRIOS TECIDOS DO PEIXE *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia
UEL – Londrina - PR

Prof Dr. Edson Luis Maistro
UNESP – São Paulo - SP

Profa. Dra. Mário Sérgio Mantovani
UEL – Londrina - PR

Londrina, 13 de fevereiro de 2009.

DEDIATÓRIA

Dedico...

*Com todo amor os meus pais Nelson e
Valdecira pelo amor, incentivo e confiança.*

*À Renata, minha
irmã, pelo carinho e motivação...*

*Ao Eder, meu amor e
companheiro, pelo carinho e
compreensão em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular e a CAPES pela oportunidade oferecida.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, que contribuíram com seus conhecimentos para a minha formação acadêmica.

À Banca Examinadora, meu muito obrigada pelas valiosas contribuições, que colaboraram para a melhoria desse trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Helena Sofia, meu muito obrigada por ter me orientado, por ter muita paciência e dedicação. Muito obrigada por me ensinar conhecimentos científicos, e também por me ajudar a amadurecer!

À Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez, por também me orientar e me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigada por estar sempre disposta a solucionar as minhas dúvidas e me ajudar a crescer tanto no pessoal quanto no profissional!

À Sueli, secretária do Programa de Mestrado, pela amizade e disponibilidade.

À Profa. Dra. Leda M. K. Sodré pelos conselhos, amizade e por esclarecer dúvidas

À Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida, pelos momentos de alegria e de descontração, meu muito obrigada!

Aos técnicos do interlaboratório, Dário e Melyssa e pela disponibilidade e ajuda, meu muito obrigada!

À Profa. Dra. Marta Marques de Souza, pelas importantes sugestões destinadas ao trabalho e pela amizade. Ao pessoal do Laboratório de Genética e Ecologia de Animal (LAGEA): Rafael, Yuldi, Karen, Gabi, Douglas, Leandro, Carluxa, Fram, Natália, Alessandra, Rafael Caconde, Bruno, Stephane, Bruna e Carol.

Ao Pessoal do Laboratório de Ecofisiologia e Ecologia Animal (LEFA): Dalita, Nelissa, Thais, Andréa, Kathya, Lindalva, Renata, Lú (Loira), Gabriel, Juliana, Marina, Tato, Francisco.

Em especial à “turma do cometa”: Dalita, Natália, Rafael, Renata, Nelissa, Thais pela ajuda em todos os experimentos, sempre prontos a colaborar no que fosse preciso, meu muito obrigada!!!

A Andréa, minha companheira em todos os experimentos, obrigada pela força!

À Jú e a Marcela pela amizade e companheirismo nestes dois anos de convivência!

Ao Eder, companheiro e amigo nesta fase da minha vida. Obrigada pela paciência, compreensão, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e também pelos momentos de alegria!

Aos meus tios Clécius e Valéria, por terem me ajudado nesses dois anos que morei em Londrina.

À minha avó, Zilda, que para mim é muito especial e sempre esteve ao meu lado em tudo que precisei, meu muito obrigada!

O meu avô, Orlando, uma pessoa muito especial e exemplo de perseverança!

À minha família mãe, pai e irmã, que são muito importantes para mim.
Obrigada por sempre acreditaram em mim, por todo amor, carinho e por estarem presentes em
minha vida.

À Deus, força maior, que está sempre comigo me auxiliando!!!

*Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos
deixam sós. Deixam um pouco de si, levam
um pouco de nós. (O Pequeno Príncipe)*

MONTEIRO, Vanessa. **A exposição aguda ao chumbo induz danos no DNA de vários tecidos do peixe *Prochilodus lineatus***. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2008.

RESUMO

Atualmente muitos trabalhos relatam a presença de poluição por metais nos corpos d'água. Dentre estes metais o chumbo (Pb) é considerado um agente químico de grande impacto ambiental, por ser extremamente tóxico aos organismos vivos e de ampla utilização na indústria de diversos produtos. Considerando-se o potencial tóxico do chumbo e a necessidade de informação sobre seus efeitos para as espécies de peixes neotropicais, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico do chumbo para a espécie de peixe *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como curimba. Para tanto grupos de 10 exemplares jovens de *P. lineatus* foram expostos a uma concentração de 0,48 mg. L⁻¹ Pb dissolvido ou em água pura (controle negativo) pelos períodos de 6, 24 e 96 h. Além disso, foi realizado um teste de toxicidade in vitro, no qual células sanguíneas de *P. lineatus* foram expostas ao chumbo durante 1, 3 e 6 h. Para a avaliação dos danos genotóxicos foram empregados o ensaio do cometa para os eritrócitos, células branquiais e hepáticas, além do teste do micronúcleo e análise da ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares. Os resultados obtidos indicaram que o chumbo promove danos genotóxicos em eritrócitos, células branquiais e de fígado de *P. lineatus*. Os escores médios obtidos no ensaio do cometa para os três tecidos analisados de *P. lineatus* após exposição de 96h ao chumbo foram significativamente maiores do que seus respectivos controles negativos. A frequência de micronúcleo foi muito baixa e não se mostrou significativa após exposição ao chumbo. Entretanto, a frequência de alterações eritrocíticas nucleares foi maior após exposições de 24 e 96 h. O ensaio do cometa realizado com eritrócitos expostos, in vitro, ao chumbo mostrou um aumento significativo de danos no DNA após 1, 3 e 6 h. Com base nestes resultados, tanto nos testes in vivo quanto in vitro, pode-se dizer que o chumbo apresenta um potencial genotóxico para a espécie *P. lineatus*, promovendo fragmentação do DNA. O chumbo não mostrou efeitos aneugênicos ou clatogênicos, como indicado pelo resultado do teste do micronúcleo; entretanto, a ocorrência de anormalidades nucleares eritrocíticas reforça a toxicidade do chumbo em células sanguíneas.

Palavras-chave: Alterações eritrocíticas nucleares. Chumbo. Ensaio do cometa. Teste do micronúcleo. *Prochilodus lineatus*.

MONTEIRO, Vanessa. **Acute lead exposure leads to DNA damage in various tissues of the fish *Prochilodus lineatus***. 2008. 71 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, 2008.

ABSTRACT

Currently there are many works describing the presence of metal pollution in water bodies. Among these metals, lead (Pb) is considered a chemical of great environmental impact due to its high toxicity to live organisms and its wide use in the industrial process of many products. Considering its toxicity and the lack of knowledge concerning lead effects to neotropical fish species, the aim of this work was to evaluate the genotoxicity of lead to the fish *Prochilodus lineatus*, also known as curimba. Thus, juveniles of *P. lineatus* were exposed to 0.48 mg of dissolved Pb. L⁻¹ or only to water (negative control) for 6, 24 and 96 hours, in static toxicity tests. Besides, in vitro toxicity tests were carried out with erythrocytes of *P. lineatus* exposed to the same lead concentration during 1, 3 and 6 hours. Genotoxic damages in erythrocytes, gill and liver cells were analyzed through the comet assay; micronucleus (MN) test and the analysis of other nuclear abnormalities (ENA) were also applied to RBC. The results showed that lead promotes genotoxic damages in RBC, gills and liver cells of *P. lineatus*. The mean scores of damage obtained in the comet assay, for the three tissues analyzed, after 96h of lead exposure, were significantly higher in relation to their respective negative controls. MN frequencies were very low and no significant alteration was registered after lead exposure. However, ENA frequencies were significantly higher after 24 and 96 h of lead exposure when compared to respective controls. The comet assay with the erythrocytes submitted to in vitro tests showed a significant increase in DNA damage after 1, 3 and 6 h of lead exposure. These results showed that lead, both in vivo and in vitro, was genotoxic to *P. lineatus* producing DNA breakages in blood, gills and liver cells. Lead did not show aneugenic or clastogenic effects, as indicated by the MN test results; however, the occurrence of erythrocytic nuclear abnormalities reinforced the toxicity of lead to red blood cells.

Keywords: Comet assay. Erythrocytic nuclear abnormalities. Lead. Micronucleus test. *Prochilodus lineatus*.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Frequência relativa de nucleóides observados em cada uma das classes de cometa e média de nucleóides danificados em eritrócitos, células branquiais e células de fígado de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. N= número de animais analisados 36
- Tabela 2** – Frequência média de ocorrência (para cada 1000 eritrócitos analisados) de micronúcleos e das alterações eritrocíticas nucleares nos peixes do grupo controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após 6, 24 e 96 h de exposição. N=número de animais analisados..... 39
- Tabela 3** – Frequência relativa de nucleóides (%) observados em cada uma das classes de cometa e média de nucleóides danificados em eritrócitos de *P. lineatus* expostos in vitro ao chumbo (Pb) ou apenas em PBS (CN) após 1, 3 e 6 h. N = número de animais analisados..... 40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Escores de danos no DNA, obtidos pelo ensaio do cometa, para eritrócitos de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo CN, # indica diferença significativa em relação ao Pb 37
- Figura 2** – Escores de danos no DNA, obtidos pelo ensaio do cometa, para células de brânquias de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo CN 37
- Figura 3** – Escores de danos no DNA, obtidos pelo ensaio do cometa, para células do fígado de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo CN 38
- Figura 4** – Frequência de ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares em *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferenças significativas em relação ao respectivo CN..... 38
- Figura 5** – Escores de danos no DNA, obtidos pelo ensaio do cometa in vitro, em eritrócitos de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN) e experimental (Pb), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo CN e # indica a diferença significativa entre os grupos Pb..... 40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	POLUIÇÃO AQUÁTICA	14
1.1.1	Chumbo.....	15
1.2	GENÉTICA TOXICOLÓGICA	17
1.2.1	Ensaio do Cometa	18
1.2.2	Teste do Micronúcleo e Alterações Eritrocíticas Nucleares.....	19
1.3	GENOTOXICIDADE DO CHUMBO	21
1.4	O USO DE PEIXES COMO MODELO EXPERIMENTAL EM TESTES DE GENOTOXICIDADE	22
2	OBJETIVOS	24
3	ARTIGO	25
3.1	A EXPOSIÇÃO AGUDA AO CHUMBO INDUZ DANOS NO DNA DE VÁRIOS TECIDOS DO PEIXE <i>PROCHILODUS LINEATUS</i>	25
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA

Durante as últimas três décadas, a comunidade científica e agências reguladoras têm tomado consciência sobre os impactos ambientais e a sustentabilidade dos ecossistemas (Bickham et al., 2000). Como consequência do crescimento da população humana e do desenvolvimento industrial, a produção, o consumo e a eliminação de resíduos de produtos químicos antropogênicos continua aumentando (Jha, 2004) podendo gerar poluição no ar, no solo e na água (Sánchez-Chardi et al., 2007).

Os ambientes aquáticos são utilizados em todo o mundo com finalidades distintas, entre as quais se destacam o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura e a harmonia paisagística (Sperling, 1993). No entanto, nas últimas décadas, esse precioso recurso vem sendo ameaçado pelas ações indevidas do homem e pela degradação ambiental, o que acaba resultando em prejuízo para a própria humanidade (Lacher e Golgstein, 1997; Moraes e Jordão, 2002; Bozzetti e Schulz, 2004).

O ambiente aquático é muitas vezes o destino final da grande quantidade e variedade de contaminantes químicos exógenos liberados pelas comunidades urbanas, propriedades rurais e industriais (Claxton et al., 1998; Van Der Oost et al., 2003, Atli e Canli, 2007). A grande proporção dos contaminantes aquáticos de origem antropogênica é composta de substâncias potencialmente genotóxicas e carcinogênicas (Claxton et al., 1998; Jha, 2004). Nos numerosos ecossistemas aquáticos do Brasil, as espécies nativas freqüentemente são ameaçadas diretamente por sua exposição aos agentes químicos carregados pela água ou, indiretamente, por alimentos contaminados (Oliveira-Ribeiro et al., 2000).

Nos últimos anos milhares de poluentes orgânicos, tais como bifenilas policlorados (PCB), pesticidas organoclorados (OCPs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), furanos (PCDF) e dioxinas (PCDD) tem sido produzidos e, em parte, liberados no meio ambiente (Van Der Oost et al., 2003). Além destes, o petróleo, seus derivados e os metais pesados também merecem uma grande atenção.

Dentre os metais o cobre, zinco, cádmio, chumbo, alumínio e mercúrio (Sanchez-Galan et al., 1999; Martinez e Cólus, 2002; Cestari et al., 2004) podem ser naturalmente incorporados aos sistemas aquáticos em pequena escala, por meio de processos

geoquímicos. Entretanto, ultimamente, a entrada de metais no ambiente aquático tem sido proveniente principalmente de processos de urbanização e industrialização (Rodriguez, 1998). Esses metais, quando ocorrem em concentrações mais elevadas, tornam-se tóxicos para todos os organismos vivos (Has-Schön et al., 2006), apresentam persistência e tendência a acumularem-se na água e nos sedimentos, além de terem potencialidade de induzir danos ao material genético (Prá et al., 2006).

1.1.1 Chumbo

O chumbo (Pb), um metal pesado natural, possui uma cor cinza-azulada é inodoro, maleável e sensível ao ar. Pertence ao grupo IVB da tabela periódica e possui peso atômico 207,2 (Paoliello e Chasin, 2001, Castro-González e Méndez-Armenta, 2008). Este metal é relativamente abundante na crosta terrestre, tendo uma concentração média entre 10 e 20 mg/Kg. As maiores fontes naturais de chumbo são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas (Paoliello e Chasin, 2001). Ele atinge o sistema aquático por causa da erosão dos solos e deposição atmosférica (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008).

O chumbo pode ser encontrado em suas formas orgânicas e inorgânicas, estando presente em solos, água e alimentos (Barciszewska et al., 2005). É talvez o químico tóxico ambiental mais antigo e o mais usado (Valverde et al., 2002). Além disso, é amplamente distribuído como contaminante ambiental e ocupacional e continua a ser um dos mais importantes problemas de saúde (Fracasso et al., 2002; Castro-González e Méndez-Armenta, 2008). Níveis ambientais de chumbo aumentaram mais de 1000 vezes ao longo dos últimos três séculos como resultado da atividade humana sendo que o maior aumento ocorreu entre os anos 1950 e 2000 (ATSDR, 2005).

Uma combinação de propriedades físicas e químicas torna o chumbo um metal extremamente utilizado em processos industriais. Ele é muito usado na manufatura de baterias, aditivos de combustível, de tubulações, de pigmentos, de soldas, de tintas de impressoras, de esmalte vitrificado para louças, de corantes, de explosivos, inseticidas, plásticos, entre outros (ATSDR, 1993, Araújo et al., 2001; Danadevi et al., 2003). A concentração natural de chumbo nas águas superficiais foi estimada na ordem de $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Entretanto, áreas próximas de minas de chumbo, de indústrias de baterias e de refinarias estão sujeitas a altos níveis desse metal. Um estudo realizado por Yabe e Oliveira (1998), avaliando a ocorrência de alguns metais na bacia do rio Tibagi, indicou níveis extremamente elevados de chumbo na água nas proximidades de uma fábrica de bateria ($4504 \pm 418 \mu\text{g Pb.L}^{-1}$).

Devido a sua grande utilização na indústria, o chumbo tem atraído a atenção de vários pesquisadores para as questões de contaminação ambiental. Isto se deve, em parte, à grande toxicidade deste metal, bem como, ao aumento nas intoxicações por chumbo e seus derivados nos ecossistemas aquáticos, em consequência das atividades industriais (Pain, 1995). O chumbo é capaz de promover uma resposta positiva a uma extraordinária gama de testes biológicos e bioquímicos, interferir na fidelidade da síntese de DNA, promover mutação, aberrações cromossômicas, câncer e defeitos congênitos (Valverde et al., 2002).

Um aspecto preocupante no que se refere ao chumbo relaciona-se ao fato deste ser um poluente tóxico não essencial que se acumula no organismo (Moreira e Moreira, 2004), causando disfunções fisiológicas em seres humanos e diversos animais (Courtois et al., 2003; Barciszewska et al., 2005). Algumas destas disfunções incluem: anemias, nefrites, insuficiência mental, envelhecimento prematuro, impotência, distúrbios no ciclo menstrual, entre outras (ATSDR, 1993). O chumbo reage com muitas biomoléculas ou complexos e afeta negativamente a reprodução, sistema nervoso, gastrointestinal, imune, renal, cardiovascular, ósseo, muscular e sistemas hematopoiético, bem como processos de desenvolvimento (Johnson, 1998).

Os mecanismos moleculares da toxicidade do chumbo não são totalmente compreendidos, mas evidências indicam que ele pode agir pela competição com cátions endógenos, como o cálcio e o zinco, por sítios de ligação em proteínas (Barciszewska et al., 2005). Esta substituição pode promover mais alterações nestas proteínas e, conseqüentemente, pode alterar o metabolismo celular e induzir distúrbios na transcrição gênica (Wozniak e Blasiak, 2003).

A presença de chumbo no núcleo pode resultar em efeitos adversos sobre a função genética. Estudos *in vitro* demonstraram que o chumbo interage com proteínas e ácidos nucleicos (Gerber et al., 1980; Tajmir-Riahi et al., 1993). Além disso, mecanismos indiretos de danos à molécula de DNA foram relatados, como por exemplo, a inibição do reparo da molécula de DNA (Johnson, 1998). Outros estudos mostraram, também, que o chumbo pode gerar espécies reativas de oxigênio (Hiraku e Kawanishi, 1996; Prá et al., 2006), que interagem com a molécula de DNA, causando danos a mesma.

1.2 GENÉTICA TOXICOLÓGICA

Devido a vulnerabilidade do material genético a diferentes agentes químicos, criou-se uma nova área de pesquisa, a genética toxicológica (Rabello-Gay et al., 1991; Shugart, 1995), que busca avaliar o potencial de danos às células, o mecanismo de ação das substâncias, bem como fazer de genotoxicidade e carcinogênese (Ribeiro e Marques, 2003).

De acordo com Shugart (1995), agentes químicos que produzem alterações nos ácidos nucleicos em exposições subletais, que resultam em mudanças nas características hereditárias, ou aparecimentos de alterações no DNA, são classificados como genotóxicos. Efeitos genotóxicos incluem alterações na estrutura e função do DNA como, por exemplo, quebras das fitas da molécula de DNA, formação de aductos de DNA, modificações de bases e mutações de ponto (Lee e Steinert, 2003; Atienzar e Jha, 2006). Em geral, esses efeitos em sua maioria, ocorrem em tecidos somáticos e se manifestam ao nível molecular da organização biológica. Entretanto, quando atingem células reprodutoras, as mudanças produzidas no DNA poderão ser transmitidas aos descendentes, comprometendo as futuras gerações (Bickham et al., 2000).

Agentes genotóxicos estão sendo avaliados através de biomarcadores que são definidos como qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente no nível sub-individual, medida dentro do organismo ou em seus produtos, que indica um desvio do estado normal e que não pode ser detectada no organismo intacto (Van Gestel e Van Brummelen, 1996). Assim, o biomarcador é utilizado como um sinal prévio refletindo a alteração biológica causada por uma substância (Van Der Oost et al., 2003). Biomarcadores de genotoxicidade já foram desenvolvidos com organismos aquáticos, para a avaliação do potencial genotóxico de diferentes agentes químicos sobre tais organismos, dentre os quais se destacam o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo (Bücker et al., 2006). O primeiro se baseia na análise de quebras nas fitas da molécula do DNA, que podem ser passíveis de reparo. O micronúcleo é formado por pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina que resultam de quebras cromossômicas ou aneuploidia durante a divisão celular (Bolognesi et al., 2004,).

1.2.1 Ensaio do Cometa

Desde a década de 90, este ensaio tornou-se um instrumento fundamental utilizado por investigadores interessados em estudos de genética toxicológica nas áreas de pesquisa humana e biomonitoramento ambiental (Fairbairn et al., 1995; Tice, et al., 1995; Monteith e Vanstone, 1995; Collins et al., 1997; Tice et al., 2000; Collins, 2004).

O ensaio do cometa (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) é um método simples de determinação de quebras em fita de DNA em células eucarióticas (Collins, 2004). Este ensaio tem sido usado como referência para avaliação de fragmentação do DNA ao nível celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Castro, 2004; Dehon et al., 2008) e baseia-se na detecção de fragmentos de DNA que migram mais rapidamente durante a eletroforese do que o DNA intacto, formando uma cauda (Tice, et al., 2000).

Rydberg e Johanson, em 1978, foram os primeiros pesquisadores que quantificaram danos diretamente na molécula de DNA de células individuais, ao lisarem as células embebidas em agarose em condições alcalinas (Gontijo e Tice, 2003; Witte et al., 2007). Anos mais tarde o ensaio do cometa foi descrito por Östling e Johanson (1984) para detectar danos no DNA em condições neutras de pH (Tice et al., 2000). Nessas condições de pH, não era possível a separação das proteínas histônicas da molécula de DNA, ficando o ensaio limitado a mensurar apenas quebras de fitas duplas do DNA. Em 1988, Singh et al. realizaram este ensaio em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$), que promove a separação das proteínas histônicas da molécula de DNA. Tal modificação permite que o ensaio do cometa indique a ocorrência de quebras de fita simples, sítios álcali-lábeis e ligações cruzadas no DNA (Lee e Steinert, 2003).

Para a realização do ensaio do cometa as células individualizadas são embebidas em agarose e colocadas em lâminas para microscópio; estas são colocadas em uma solução neutra para lise, para então serem submetidas a uma eletroforese a baixa voltagem em pH básico ($\text{pH} > 13$). As células são coradas com corante fluorescente específico para DNA e o DNA de células individualizadas é visualizado por microscopia de fluorescência (Gontijo e Tice, 2003; Collins, 2004).

Devido à sua simplicidade, sensibilidade e baixo custo, o ensaio do cometa foi rapidamente adotado para determinar o potencial genotóxico de produtos químicos (Jha, 2008). Nos últimos anos uma série de estudos comprovou a eficiência deste teste para avaliações de genotoxicidade (Tice et al., 2000; Lee e Steinert, 2003; Collins, 2004; Lemos et

al., 2005). Uma das vantagens do ensaio do cometa inclui a avaliação de danos do DNA em células individuais, sendo, necessário um número pequeno de células para realizar o ensaio. Além disso, ele é muito sensível para detectar danos na molécula de DNA, reparo e morte celular em diferentes tipos de células (Leroy et al., 1996; Collins et al., 1996, Tice et al., 2000; Lee e Steinert, 2003; Jha, 2008).

Este ensaio tem sido aplicado com sucesso a um grupo heterogêneo de organismos incluindo plantas inferiores e superiores, oligoquetos, poliquetas, planárias, crustáceos, insetos, moluscos bivalves e gastrópodes, asteróides e equinóides, peixes, anfíbios e mamíferos (Jha, 2008; Dhawan et al., 2009). Para organismos aquáticos esse ensaio tem se mostrado bastante eficiente na detecção de danos na molécula do DNA provocados, direta ou indiretamente, por agentes genotóxicos presentes em ambientes aquáticos (Matsumoto et al., 2006; Vanzella et al., 2007; Jha, 2008), como por exemplo, o benzeno (Bücker et al., 2006), o óleo diesel (Vanzella et al., 2007), os metais pesados (Cestari et al., 2004), agrotóxicos (Cavalcante et al., 2008), entre outros.

Para os peixes, os eritrócitos são as principais células utilizadas neste tipo de ensaio, enquanto que, nos estudos envolvendo moluscos e crustáceos, os hemócitos da hemolinfa são as células mais comumente utilizadas (Lee e Steinert, 2003). Entretanto, outros tecidos também podem ser utilizados para detecção de danos no DNA. Em peixes, os tecidos utilizados para este ensaio incluem intestino, fígado, rim, músculo, baço, brânquias e gônadas (Kim et al., 2000; Lee e Steinert, 2003). Kilemade et al. (2004) analisaram danos no DNA em vários tecidos como epiderme, brânquias, baço e fígado de peixe *Scophthalmus maximus* e observaram que as células do fígado e das brânquias se mostraram mais sensíveis que as células de baço e epiderme.

1.2.2 Teste do Micronúcleo e Alterações Eritrocíticas Nucleares

Deformações nucleares podem ser causadas pela exposição de organismos vivos a substâncias tóxicas presentes no meio e podem ser ou não transmitidas para outras gerações (Rodrigues et al., 2005). Uma dessas deformações em células nucleadas de mais fácil investigação é a presença de micronúcleos (Rodrigues e Castilhos, 2003). Os micronúcleos são fragmentos cromossômicos, resultantes de danos na molécula de DNA ou de cromossomos inteiros, que não são reincorporados aos núcleos das células filhas e são,

portanto, transformados em pequenos núcleos ou micronúcleos (Jenssen e Ramel, 1980; Grisolia, 2002). O teste do micronúcleo baseia-se na identificação e quantificação destes micronúcleos e para que o micronúcleo seja visualizado é necessária uma divisão celular após o evento genotóxico. Este teste propicia a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) e tem sido amplamente utilizado para avaliar um grande número de substâncias em vários organismos (Villela et al., 2003).

Para ser considerado um micronúcleo, algumas características devem ser levadas em consideração, como por exemplo, ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal, ter diâmetro entre 1/16 até 1/3 do núcleo principal, não ser refringente, não estar ligado ou conectado ao núcleo principal, possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal, embora às vezes possa apresentar coloração um pouco mais intensa (AI-Sabti e Metcalfe, 1995).

O teste do micronúcleo é muito usado para estimar os danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos. Embora a maioria dos trabalhos apresente resultados com mamíferos (especialmente roedores), o teste do micronúcleo também é uma ferramenta útil para indivíduos de outros grupos, como o de peixes (Udroiu, 2006).

Comparado com outros testes citogenéticos, possui diversas vantagens, como, por exemplo, rapidez e a facilidade da análise, além da não exigência de células em metáfase (Tucker e Preston, 1996). Entretanto, uma limitação para o uso deste teste é que agentes ou substâncias que não quebram cromossomos ou não causam a perda destes na anáfase, não serão detectados, por exemplo, citam-se as aberrações que envolvem rearranjo cromossômico sem ocorrência de fragmento acêntrico (Heddle, et al., 1983).

Por ser um teste simples, rápido e de baixo custo, o teste de micronúcleo (MN) é amplamente utilizado para o biomonitoramento da qualidade d água (Minissi et al, 1996; Sanchez-Galan, et al., 1998; Grisolia e Starling 2001), como também para testar a genotoxicidade de agentes químicos (Nepomuceno et al., 1997; Campana et al., 1999). Para espécies de peixes, o teste do micronúcleo apresenta várias vantagens sobre outros estudos citogenéticos, como troca de cromátides irmãs ou aberrações cromossômicas, e vários tecidos podem ser utilizados para este, como por exemplo, células de brânquias e fígado, além dos eritrócitos.

Além da ocorrência de micronúcleos, outras alterações eritrocíticas nucleares foram descritas em eritrócitos de peixes por Carrasco et al. (1990) e classificadas em: 1) núcleo segmentado; 2) núcleo lobulado; 3) núcleo com constrição ou em “forma de

rim”, 4) núcleos com vacúolos e 5) células binucleadas. Embora os mecanismos de formação destas anormalidades não estejam totalmente explicados, essas alterações são consideradas como indicadores de danos genotóxicos, complementando o teste do micronúcleo na avaliação de genotoxicidade (Ayllon e Garcia Vazquez, 2000; Çavas e Ergene-Gözükara 2005). Essas anormalidades podem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processos de morte celular, de genotoxicidade e/ou mutagenicidade (Fenech, 2006). Em peixes, algumas destas alterações nucleares, assim como a ocorrência de micronúcleos, têm sido relatadas após a exposição a agentes químicos ou águas poluídas. Ayllon e Garcia Vazquez (2000) observaram um aumento de anormalidades nucleares e micronúcleos em eritrócitos de *Poecilia latipinna* injetados intraperitonealmente com mercúrio. Ayllon e Garcia-Vazquez (2001) observaram, além de eritócitos micronucleados, a ocorrência de alterações nucleares nesses eritrócitos de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), quando expostos a ciclofosfamida e mitomicina-c, compostos clastogênicos. Çavas e Ergene-Gözükara (2003) observaram um aumento significativo de células micronucleadas e anormalidades em eritrócitos periféricos de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), após a exposição à ciclofosfamida e ao efluente têxtil. Ventura et al. (2008) também observaram um aumento significativo de células micronucleadas e anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações de atrazina.

1.3 GENOTOXICIDADE DO CHUMBO

Estudos de genotoxicidade sobre os compostos metálicos e seus compostos orgânicos são muito importantes, especialmente na investigação dos efeitos destes compostos em meio aquático, onde tendem a se acumular (Ferraro et al., 2004). Os peixes são capazes de reter e absorver metais pesados dissolvidos na água através de processos ativos ou passivos. Diferentes tecidos geralmente apresentam diferente capacidade de acumular metais pesados. Um trabalho realizado por Suiçmez et al. (2006) mostrou que o acúmulo de chumbo foi maior em brânquias, seguido do fígado e músculo de *Oncorhynchus mykiss*. O mesmo também foi observado por Kalay et al. (1999) em de *Tilapia zillii* exposta por 14 dias a diferentes concentrações de chumbo.

Zhang et al. (2008), observaram um aumento de danos na molécula de DNA em células de hepatopâncreas do peixe *Misgurnus anguillicaudatus*, exposto a diferentes

concentrações de chumbo. Em um estudo relativamente recente Ferraro et al. (2004) analisaram o efeito genotóxico do chumbo na espécie de peixe *Hoplias malabaricus*, espécie neotropical, concluindo que o chumbo aumentou significativamente o número de danos no DNA desta espécie neotropical. Em um trabalho complementar, este mesmo grupo de pesquisadores avaliou o efeito genotóxico do chumbo induzido por doses tróficas de chumbo nesta mesma espécie de peixe (Cestari et al., 2004), encontrando também danos ao material genético dos animais expostos a este metal.

Os testes de toxicidade podem ser empregados a vários organismos. Além de peixes, mamíferos também podem ser utilizados para avaliar danos genotóxicos promovidos por agentes tóxicos. Devi et al. (2000), mostraram, através do ensaio do cometa, um aumento significativo de danos na molécula de DNA de células sanguíneas de ratos tratados oralmente com diferentes doses de nitrato de chumbo. Além disso, Jagetia e Aruna (1998) observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos (MN) na medula óssea dos ratos.

Yáñez et al. (2003) observaram um aumento significativo de danos na molécula de DNA de crianças de uma cidade mexicana próxima a uma mina contaminada com chumbo. O chumbo é um perigo profissional e ambiental em todo o mundo, tornando-se uma importante questão de saúde ambiental nos últimos anos. Danadevi et al. (2003), verificaram aumento de danos na molécula de DNA em profissionais expostos a partículas de Pb no ar e nas emissões no interior do local de trabalho na Índia. Fracasso et al. (2001) também observaram um aumento significativo de danos no DNA de linfócitos de trabalhadores expostos ao chumbo.

Apesar das evidências da genotoxicidade do chumbo, o conhecimento sobre o potencial genotóxico deste metal e de seu mecanismo de toxicidade ainda é pouco conhecido para as espécies de peixes neotropicais.

1.4 O USO DE PEIXES COMO MODELO EXPERIMENTAL EM TESTES DE GENOTOXICIDADE

Entre os diversos organismos que habitam os ambientes aquáticos, os peixes e moluscos são considerados bons indicadores para a detecção de contaminação de recursos hídricos por substâncias genotóxicas (Sánchez-Galán et al., 1998).

Uma das vantagens na utilização de peixes como organismos-testes deve-se à facilidade com que eles podem ser mantidos em laboratório e expostos a produtos químicos, e as semelhanças de suas respostas a esses produtos com outros vertebrados, podendo desse modo, ser usados para a projeção da ação desses agentes teratogênicos e mutagênicos para outros grupos de animais (Al-Sabit e Metcalfe, 1995).

No Brasil, os testes de genotoxicidade têm sido empregados desde a década de 80 para avaliações ambientais (Umbuzeiro e Valent, 1998), mas o uso de espécies de peixes neotropicais para o estudo de efeitos genotóxicos de agentes químicos é ainda relativamente pequeno (Matsumoto e Cólus, 2000; Cestari et al, 2004).

Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1847) é um peixe pertencente à família *Prochilodontidae*, ordem Characiformes e superordem Ostariophysi, conhecido popularmente como curimba. Esta espécie de peixe neotropical tem se mostrado bastante adequada para estudos de avaliação da toxicidade de diferentes agentes xenobióticos (Martinez e Cólus, 2002; Almeida et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006) dada a sua sensibilidade aos efeitos de poluentes presentes na água e também no sedimento, devido ao seu hábito alimentar.

O curimba possui hábito alimentar detritívoro consumindo quase que exclusivamente finas partículas do lodo, além de detritos orgânicos e diatomáceas (Domingues, Hayashi, 1998). Devido ao seu hábito alimentar, esta espécie pode entrar em contato com xenobióticos presentes tanto no sedimento quanto na água; além disso, alguns estudos já mostraram que esta espécie é sensível a diferentes substâncias tóxicas, como metais (Martinez et al., 2004), derivados de petróleo (Simonato et al., 2008; Vanzella et al. 2007) e agrotóxicos (Langiano e Martinez, 2007; Cavalcante et al, 2008, Pereira Maduenho e Martinez, 2008); assim, pode ser considerada um biodindicador para o monitoramento ambiental (Cerqueira e Fernandes, 2002).

2 OBJETIVOS

- Verificar a genotoxicidade do chumbo, in vivo, em diferentes tecidos (sangue, brânquia e fígado) de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo por 6, 24 e 96 horas (tratamento agudo), por meio do ensaio do cometa, teste do micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares.
- Avaliar o potencial genotóxico do chumbo in vitro analisando-se a ocorrência de danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus* por meio do teste do cometa.

3 ARTIGO

3.1 A EXPOSIÇÃO AGUDA AO CHUMBO INDUZ DANOS NO DNA DE VÁRIOS TECIDOS DO PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS*.

Monteiro, V.; Martinez, C. B. R.; Sofia, H. S.

Artigo a ser submetido para o periódico Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.

A EXPOSIÇÃO AGUDA AO CHUMBO INDUZ DANOS NO DNA DE VÁRIOS TECIDOS DO PEIXE

PROCHILODUS LINEATUS.**Monteiro, V.¹; Martinez, C. B. R.²; Sofia, H. S.^{1*}****Resumo**

O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos genotóxicos do chumbo para *Prochilodus lineatus*, após exposições a 0,48 mg Pb dissolvido. L⁻¹ durante 6, 24 e 96 h. Foi realizado também um teste de genotóxico in vitro com células de sangue de *P. lineatus* expostas ao chumbo durante 1, 3 e 6 h. Para as avaliações genotóxicas foi empregado o ensaio do cometa (EC) com células de sangue, brânquia e fígado, o micronúcleo (MN) e a ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares (AENs). Os escores de danos no DNA, obtidos no EC, foram significativamente maiores nos três tecidos analisados após 96 h de exposição ao chumbo, em relação aos respectivos controles negativos. A frequência de MN foi muito baixa e não se alterou após a exposição ao Pb. Já a frequência de AENs foi maior após 24 e 96 h de exposição ao Pb. O EC realizados com os eritrócitos expostos in vitro ao Pb indicou aumento no escore de dano no DNA após 1, 3 e 6 h de exposição. Com base nestes resultados pode-se afirmar que tanto nos testes in vivo quanto in vitro, o chumbo foi genotóxico para *P. lineatus*, promovendo fragmentação do DNA. Esse efeito genotóxico do metal deve ser indireto, pois só ocorreu após 96 h de exposição, e é provavelmente decorrente da ação de espécies reativas de oxigênio sobre o DNA. O chumbo não mostrou efeitos aneugênicos ou clastogênicos, como indicado pelo resultado do teste do micronúcleo; entretanto, as ocorrências de anormalidades nucleares eritrocíticas reforçam a toxicidade do chumbo em células sanguíneas.

Palavras-chave: Alterações eritrocíticas nucleares. Chumbo. Ensaio do cometa. Teste do micronúcleo.

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados podem alterar toda e qualquer atividade biológica [1]. Dentre estes metais destaca-se o chumbo (Pb), um metal pesado natural que pode ser encontrado em suas formas orgânicas e inorgânicas, estando presente em solos, água e alimentos [2]. É um metal relativamente abundante na crosta terrestre, tendo uma

¹ Departamento de Biologia Geral

^{1*} Departamento de Biologia Geral - Tel.: +55 43 371.4437; E-mail: shsofia@uel.br - C.P. 6001, CEP: 86051-990.

² Departamento de Ciências Fisiológicas; Universidade Estadual de Londrina

concentração média entre 10 e 20 mg.Kg⁻¹ e pode atingir o sistema aquático através da erosão dos solos e deposição atmosférica [3, 4]. Além disso, o chumbo é talvez o químico tóxico ambiental mais antigo e o mais usado [5], amplamente distribuído como contaminante ambiental e ocupacional e a intoxicação por chumbo é um importante problema de saúde pública [4, 6]. Níveis ambientais de chumbo aumentaram mais de 1000 vezes ao longo dos últimos três séculos como resultado da atividade humana, sendo que o maior aumento ocorreu entre os anos 1950 e 2000 [7].

Uma combinação de propriedades físicas e químicas torna o chumbo um metal adequado para vários processos industriais, e por isso, ele é muito utilizado na indústria de baterias, de tubulações, de pigmentos, de soldas, e como aditivo de combustível [8, 9]. Devido à sua ampla utilização na indústria e os problemas decorrentes da contaminação ambiental, o chumbo tem atraído a atenção de vários pesquisadores. Isto se deve à sua elevada toxicidade associada ao aumento das intoxicações por chumbo e seus derivados nos ecossistemas aquáticos, em consequência das atividades industriais [10]. A concentração natural de chumbo em águas superficiais foi estimada na ordem de 0,02 µg. L⁻¹. Entretanto, áreas próximas de minas de chumbo, de indústrias de baterias e de refinarias estão sujeitas a altos níveis desse metal. Estudos realizados na bacia do rio Tibagi mostraram um aumento significativo deste metal tanto na água quanto no sedimento analisado [11, 12]. Outro aspecto preocupante no que se refere ao chumbo relaciona-se ao fato deste ser um poluente tóxico não essencial que se acumula no organismo [1], causando disfunções fisiológicas em seres humanos e diversos animais [2,13].

Estudos in vitro já demonstraram que o chumbo interage com proteínas e ácidos nucleicos [14, 15]. Além disso, alguns mecanismos indiretos de danos à molécula de DNA foram relatados, tais como: indução da inibição do reparo da molécula de DNA [16], bem como indução ao câncer [6, 17]. Outros trabalhos mostraram que o chumbo pode gerar espécies reativas de oxigênio [6, 18-20], as quais podem danificar as células tanto, pela oxidação dos lipídios de membranas, quanto pela oxidação da molécula de DNA [21]. Devido a vulnerabilidade do material genético a diferentes agentes tóxicos, estudos na área da genética toxicológica vêm sendo realizados para avaliar o potencial de danos às células, o mecanismo de ação das substâncias tóxicas, bem como fazer previsões de genotoxicidade e carcinogênese [22-24]. Para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de diferentes agentes químicos, alguns testes vêm sendo realizados com organismos aquáticos, dentre os quais se destaca o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo [25]. Nos últimos anos uma

série de estudos tem comprovado a eficiência do teste do cometa em avaliações de genotoxicidade [26-31]. Este teste já se mostrou bastante sensível para quantificar danos no DNA, bem como o reparo do mesmo, e é amplamente empregado em estudos de genética toxicológica e monitoramento ambiental [27, 29, 32-35], além de ser uma técnica sensível, rápida e econômica [27, 28, 32, 33, 36].

A análise de alterações na molécula de DNA nos organismos aquáticos tem se mostrado um método adequado para avaliar a genotoxicidade de ambientes contaminados, sendo capaz de detectar exposições a baixas concentrações de contaminantes em uma ampla gama de espécies [31]. Para os peixes, os eritrócitos são as principais células utilizadas neste tipo de ensaio, entretanto, alguns tecidos também são bastante utilizados para detecção de danos no DNA como o intestino, fígado, rim, músculo, baço, brânquias e gônadas [28, 37].

Outros organismos também podem ser utilizados para a avaliação de genotoxicidade como, por exemplo, moluscos, anfíbios, crustáceos, mamíferos [38, 39].

O teste do micronúcleo é usado para estimar os danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos. Embora seja um teste desenvolvido originalmente para trabalhos com mamíferos, pode ser uma ferramenta útil para indivíduos de outros grupos, como os peixes [40], e tem sido amplamente utilizado com peixes e invertebrados aquáticos, cujos vários e minúsculos cromossomos muitas vezes inibem o uso de ensaios baseados em divisão celular [31]. Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática com aparência de pequenos núcleos que surgem da condensação de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que foram perdidos na anáfase e que não são reincorporados nos núcleos das células filhas e, portanto, transformados em pequenos núcleos ou micronúcleos [31, 41-45]. É um teste simples e rápido para o biomonitoramento da qualidade da água [46], além de ser amplamente utilizado para avaliar o impacto biológico da poluição aquática [47, 48] e para testar a genotoxicidade de compostos químicos depois da exposição direta ou indireta *in vivo* [49, 50]. Comparado com outros testes citogenéticos, possui diversas vantagens, como por exemplo, rapidez e a facilidade da análise, além da não exigência de células em metáfase [44].

O uso de espécies de peixes neotropicais para estudo de efeitos genotóxicos de agentes químicos é ainda relativamente incomum [51, 52]. *Prochilodus lineatus* (Valencienes, 1847) é uma espécie de peixe neotropical que tem se mostrado adequada para estudos de avaliação da toxicidade de diferentes agentes xenobióticos [12, 53, 54]. Por ser uma espécie de hábito alimentar detritívoro, podendo, assim, entrar em contato com xenobióticos presentes tanto no sedimento quanto na água, bem como se mostrando sensível a

diferentes substâncias tóxicas do meio [12, 55-57]. Por estas razões, *P. lineatus* pode ser considerado um bioindicador para o monitoramento ambiental [58].

Considerando-se o potencial tóxico do chumbo e a necessidade de informações sobre a genotoxicidade deste metal para espécies de peixes neotropicais, o presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos genotóxicos do chumbo, em ensaios agudos in vivo e in vitro, para a espécie *P. lineatus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Nos experimentos foram utilizados indivíduos jovens de *Prochilodus lineatus*, com peso médio de $7,47 \pm 2,13$ gramas e comprimento total de $8,73 \pm 0,88$ centímetros (média $\pm$ DP), fornecidos pela Estação de Piscicultura da UEL. Os peixes foram aclimatados por no mínimo sete dias antes dos experimentos, em tanques de 300 L preenchidos com água desclorada e continuamente aerada ($T \approx 20^\circ \text{C}$, $\text{pH} \approx 7,0$ e $\text{OD} \approx 7,8 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, dureza $\approx 60 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$), com fotoperíodo de 14 h de escuro e 10 h de luz. Os animais foram alimentados com ração com 36% de proteína (Guabi®, BR) a cada 48 horas, exceto no dia anterior ao início dos testes de toxicidade e durante os mesmos. Após a aclimação os peixes foram transferidos para aquários de vidro de 100 L, onde foram distribuídos em grupos de 10 peixes por aquário, contendo apenas água (grupo controle negativo -CN) ou água com uma concentração nominal de $5 \text{ mg Pb} \cdot \text{L}^{-1}$ (grupo Pb). O chumbo foi adicionado à água na forma de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (VETEC, BR)

2.2 EXPERIMENTOS IN VIVO

Os testes de toxicidade aguda, do tipo estático, foram realizados em três tempos experimentais: 6, 24 e 96 h. Os testes foram realizados separadamente para cada tempo de exposição, e todos eles foram realizados com réplicas. Durante os testes, a água foi continuamente monitorada para temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade, utilizando-se um analisador multiparâmetros. A dureza da água também foi monitorada e determinada por titulação com EDTA. Amostras de água foram coletadas imediatamente após cada período experimental para a análise da concentração de chumbo. O chumbo total foi

analisado em amostras de água não filtrada, enquanto que o chumbo dissolvido foi analisado em amostras de água filtradas (filtros de 0,45 μm). Após coletadas as amostras foram acidificadas com HNO_3 e a concentração de chumbo foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica.

Após cada período de exposição, os peixes eram retirados dos aquários e imediatamente anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), para a realização da biometria e coleta de sangue a partir da veia caudal, com seringas de 1 mL heparinizadas. Na sequência, os animais eram sacrificados por secção medular para a retirada da brânquia e do fígado. Do sangue coletado de cada animal uma alíquota de 10 μL foi armazenada em tubos cônicos plásticos (1,5 mL) contendo 700 μL de PBS (NaCl 126,6 mM, KCl 4,8 mM, CaCl_2 1,5 mM, NaHCO_3 3,7 mM, Na_2HPO_4 8,9 mM, NaH_2PO_4 2,9 mM) e mantidos no gelo até o momento da realização do teste do cometa.

Imediatamente após a retirada das brânquias os arcos branquiais foram separados e transferidos para uma placa de vidro contendo PBS, onde foram limpos com o auxílio de um pincel para a retirada do sangue contido nos arcos branquiais. Após a limpeza das brânquias os filamentos branquiais foram retirados e transferidos para tubos cônicos de plásticos, contendo PBS, que foram mantidos no gelo até a dissociação celular. O fígado também foi limpo em PBS com o auxílio de um pincel, para retirar o excesso de sangue, e colocado em tubos plásticos com PBS, mantidos no gelo até a preparação da suspensão.

A metodologia para a preparação da suspensão celular dos dois órgãos foi baseada no protocolo descrito por [36] et al., com modificações. Os filamentos branquiais foram seccionados com auxílio de navalhas de aço descartáveis, sobre uma placa de cera; já os fígados foram picotados com uma tesoura dentro de um microtubo. O material resultante foi transferido para tubos contendo um volume de 200 μL , no caso das brânquias, ou 500 μL , no caso do fígado, de tripsina 0,05% diluída em PBS livre de cálcio e magnésio e os tubos foram mantidos em banho-maria a 30°C por 15 min. Após esse tempo a suspensão foi homogeneizada e filtrada (30 μm) em um béquer contendo 500 μL de soro bovino fetal 10% diluído em PBS. A suspensão resultante foi centrifugada por 10 minutos a 1000 g, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspendido em 200 μL de PBS.

Um grupo de peixes injetados com uma droga reconhecidamente genotóxica foi utilizado como um grupo para o controle de indução de danos, denominado de controle positivo (CP). Para tanto, juvenis de *P. lineatus* foram anestesiados, pesados e injetados intraperitonealmente com ciclofosfamida ($0,4\text{g de ciclofosfamida.g de peixe}^{-1}$). Em seguida

os peixes foram transferidos para aquários de vidro contendo água desclorada nas mesmas condições dos grupos controle dos testes de toxicidade. Para amostragem, após cada intervalo experimental (6, 24 e 96 h) oito peixes eram retirados do aquário para a coleta de sangue, brânquia e fígado conforme descrito anteriormente.

2.3 EXPERIMENTO IN VITRO

Para a realização deste teste seis exemplares de *P. lineatus* foram anestesiados para a retirada do sangue da veia caudal, da mesma forma que foi descrita para o teste in vivo. Alíquotas de 10 μ L de sangue foram misturadas a 700 μ L de PBS em tubos cônicos de plástico (1,5 mL) que foram acondicionados em gelo até a exposição das células. Foram feito dois grupos de exposição: um controle negativo, no qual um volume de 60 μ L da solução de sangue e PBS foram adicionados a 140 μ L de PBS; e um experimental, no qual um volume de 60 μ L da solução sangue e PBS foi adicionado a 140 μ L de PBS contendo 5 mg Pb.L^{-1} (concentração nominal). Os testes in vitro foram realizados em microplacas de 24 poços durante 1, 3 e 6 h. Após cada um dos tempos de exposição foram retiradas alíquotas da suspensão celular para a realização do teste do cometa.

Para a realização do ensaio do cometa in vivo com células sanguíneas, branquiais e células do fígado, assim como para os testes in vitro, a avaliação da viabilidade celular foi feita a partir do método de exclusão pelo corante azul de Trypan [59]. Para cada amostra foram avaliadas 100 células, em câmara de Neubauer espelhada, discriminando-se as células viáveis (brancas) e as células inviáveis (azuis). A mudança de coloração da célula para azul indica que a célula não possui mais a sua membrana íntegra, permitindo a entrada do corante. O ensaio do cometa só foi realizado com amostras apresentando viabilidade de 80%, no mínimo [27].

2.4. ENSAIO DO COMETA (SCGE)

A metodologia empregada no ensaio alcalino do cometa foi baseada no protocolo de [60] et al. e [61] com algumas modificações. Para os testes com as células sanguíneas (in vivo e in vitro), branquiais e hepáticas alíquotas de 10 μ L da suspensão celular, para o sangue, ou de 15 μ L da suspensão celular, para os demais tecidos, foram adicionadas em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (preparada em PBS) e a mistura foi

mantida em banho-maria a 37°C. O volume total da suspensão foi dividido em duas lâminas de vidro, preparadas previamente, com agarose normal (69°C) 1,5% (em PBS) e cobertas com lamínula. As lâminas foram mantidas em geladeira por 30 min para a solidificação da agarose com as células.

Após a solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas contendo as células foram colocadas em uma solução de lise previamente preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, pH 10,0) e mantidas em geladeira ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) por 1 h. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese horizontal, acondicionada dentro de um recipiente escuro, contendo gelo. O tampão de eletroforese (0.3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) recém preparado e gelado (4°C) foi então adicionado à cuba e as lâminas foram mantidas submersas neste tampão alcalino por 30 min.

As lâminas foram expostas durante 20 min, a 4°C , às condições de eletroforese de 25 V (1 V.cm^{-1}) e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e cobertas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 min. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a terceira neutralização, as lâminas foram colocadas para secar e depois de secas foram fixadas em etanol 100%, por 10 minutos.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 40 μL de brometo de etídeo (20 mg.mL^{-1}), cobertas com lamínula e analisadas em um microscópio de fluorescência no aumento de 1000X, equipado com um filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Todas as lâminas foram codificadas e analisadas em teste cego por uma mesma pessoa. Após preparadas, as lâminas foram analisadas dentro de um período máximo de 30 dias. Foram examinadas 100 células por animal. Para cada célula analisada os danos do DNA foram classificados em quatro classes: 0 = sem dano visível; 1 = dano mínimo; 2 = dano médio; 3 = dano máximo. Assim, cada uma das células analisadas foi classificada de 0 (dano mínimo) a 3 (dano máximo).

Para o cálculo do escore de dano, o número de células em cada classe (1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore foi calculado pela fórmula: $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$, em que: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das classes. Assim, o escore total para as células analisadas pode variar de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 300 (dano máximo = todas as células apresentam dano de classe 3). Também foi calculado para cada animal o número de nucleóides danificados, que corresponde à soma das células com danos (classes 1, 2 e 3).

2.5 TESTE DO MICRONÚCLEO (M) E OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES ERITROCÍTICAS NUCLEARES (AENS)

O teste do micronúcleo foi realizado de acordo com [62] Para o MN e AENS foram feitos esfregaços com 5 μ L de sangue coletados de cada indivíduo, e duas lâminas por indivíduo. Após secar por 24 h em temperatura ambiente, protegidas de luz, as lâminas foram fixadas com metanol 100%, durante 10 min, e coradas por 20 min com Giemsa 5%. As lâminas foram então lavadas com água destilada, secas e preparadas para uso permanente. As análises dos MN e AENS foram realizadas em microscópio de luz, usando a objetiva de 100 vezes; foram analisadas 3000 células por animal. Para ser considerado um micronúcleo, as características observadas foram: 1) ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal; 2) ter diâmetro entre 1/16 até 1/3 do núcleo principal; 3) não ser refringente; 4) não estar ligado ou conectado ao núcleo principal; 5) possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal, embora às vezes possa apresentar coloração um pouco mais intensa. A classificação das alterações eritrocíticas nucleares foi baseada em [63] et al., sendo: 1) núcleo segmentado (NS); 2) núcleo lobulado (NL) e 3) núcleo com constrição ou em “forma de rim” (NR). Os resultados referentes à ocorrência de MN, NS, NL e NR estão apresentados como número de eritrócitos com MN ou com alterações, para cada 1.000 células analisadas (em ‰). As análises comparativas foram feitas separadamente para os resultados de MN e AENS. Para a comparação da ocorrência de AENS entre os diferentes grupos experimentais considerou-se a soma dos eritrócitos com NS+NL+NR por animal.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos testes do cometa, MN e AENS para o grupo controle e experimental, em um mesmo tempo de exposição, foram comparados entre si pelo teste t de Student. Os resultados obtidos em cada um dos tempos experimentais (6, 24 ou 96 h) no ensaio do cometa, para sangue, brânquias e fígado e para os respectivos grupos controle positivo foram comparados entre si pela análise de variância - critério único (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas SNK (Student-Newman-Keuls) quando necessário [64]. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão, e os valores de N apresentam alguma variação em virtude de perda de amostra ou problemas de manipulação.

3 RESULTADOS

3.1 PARÂMETROS DA ÁGUA

As características da água permaneceram estáveis durante os testes de toxicidade, considerando-se todos os períodos de exposição. Os valores médios ($\pm$ DP) para os grupos CN e Pb foram, temperatura ($^{\circ}\text{C}$): $23,02 \pm 2,1$; pH: $7,41 \pm 0,22$; oxigênio dissolvido ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$): $7,05 \pm 0,61$; condutividade ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$): $63,55 \pm 7,3$. A dureza da água permaneceu com valores próximos a $60 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Ao longo dos testes de toxicidade não houve mortalidade significativa nem nos grupos de peixes expostos ao chumbo e tampouco nos grupos controle.

As concentrações de chumbo foram muito semelhantes em todos os grupos experimentais, nos diferentes períodos de exposição. A média dos valores da concentração de chumbo total foi de $2,10 \pm 0,37 \text{ mg Pb} \cdot \text{L}^{-1}$ e a concentração de chumbo dissolvido de $0,48 \pm 0,04 \text{ mg Pb} \cdot \text{L}^{-1}$. No grupo controle o chumbo não foi detectado na água.

3.2 EXPERIMENTOS IN VIVO

3.2.1 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa realizado com as células sangüíneas revelou que os peixes expostos ao Pb durante 96 h apresentaram um aumento significativo na média de nucleóides danificados e no escore de danos, em relação ao respectivo CN (Tabela 1, Figura 1).

Embora as células das brânquias dos peixes expostos ao Pb durante 24 e 96 h tenham apresentado um aumento significativo na média de nucleóides danificados em relação aos respectivos CN, um aumento significativo no escore de danos do grupo Pb em relação ao seu CN ocorreu apenas após 96 h de exposição a este metal (Tabela 1, Figura 2). As análises de células do fígado mostraram que após 96 h de exposição ao Pb ocorreu um aumento significativo na média de nucleóides danificados e no escore de dano em relação ao respectivo CN (Tabela 1, Figura 3).

Em relação ao CP o ensaio do cometa revelou que em todos os tempos experimentais as células de sangue dos peixes do CP apresentaram valores significativamente

maiores tanto da média de nucleóides danificados, quanto do escore de dano, em relação aos respectivos grupos CN e Pb (Tabela 1, Figura 1). Para as células branquiais os escores de danos obtidos para o CP também aumentaram significativamente em todos os tempos experimentais, em relação aos respectivos CN (Tabela 1); entretanto, apenas no tempo de 96 h houve aumento significativo na média de nucleóides danificados nas células das brânquias do CP em relação ao respectivo CN (Figura 2). Os testes realizados com as células hepáticas mostraram que apenas após 24 e 96 h da injeção de ciclofosfamida houve aumento significativo tanto da média de nucleóides danificados como do escore de danos no grupo CP, em relação aos respectivos CN (Tabela 1, Figura 3).

3.2.2 Ocorrência de M e AEs

A Tabela 2 apresenta os resultados da frequência de ocorrência de micronúcleos e das alterações nucleares determinadas para os eritrócitos de *P. lineatus*. No tempo de 96 h houve um aumento significativo na frequência de ocorrência de núcleo em constrição nos peixes dos grupos Pb e CP em relação ao respectivo CN; neste tempo também foi observado aumento significativo na ocorrência de núcleo segmentado do CP em relação ao CN. Aumento significativo na ocorrência de núcleo lobulado só foi observado nos peixes dos grupos Pb e CP, em relação ao seu CN, no tempo de 24 h. Considerando a ocorrência de micronúcleo, não foi observado um aumento significativo do mesmo em nenhum grupo nos tempos amostrados.

Quando a ocorrência total de AENs foi considerada observou-se aumento significativo nos peixes do grupo Pb e CP, em relação ao CN, apenas no tempo de 24 h (Figura 4). Para o tempo de 96 h observou-se uma clara tendência de aumento na frequência de AENs, tanto para os peixes do grupo Pb, quanto do grupo CP, em relação ao CN, entretanto a distribuição dos resultados mostrou uma variação muito grande (EP elevado) e possíveis diferenças significativas não foram detectadas.

3.3 EXPERIMENTO IN VITRO

A viabilidade celular de células sanguíneas expostas ao chumbo no teste in vitro foi de 97,3%. Os eritrócitos expostos ao Pb apresentaram aumento significativo tanto na média de nucleóides danificados quanto no escore de dano, em relação aos respectivos CN em todos os tempos de exposição (Tabela 3, Figura 5). O escore de dano aumentou

significativamente com o aumento do tempo de exposição ao Pb, tendo sido constatada diferença significativa no tempo de 6 h em relação ao tempo de 1 h (Figura 5).

Tabela 1 – Frequência relativa de nucleóides observados em cada uma das classes de cometa e média de nucleóides danificados em eritrócitos, células branquiais e células de fígado de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. N= número de animais analisados.

Tecido	Tempo	Grupo	N	Classe de danos				Nucleóides danificados (Média ± EP) (%)
				0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Sangue	6h	CN	6	76,33	23,67	0,00	0,00	22,50 ± 4,40
		Pb	9	67,33	32,67	0,00	0,00	32,67 ± 5,61
		CP	8	30,50	61,50	7,25	0,88	66,00 ± 6,92*#
	24h	CN	8	67,50	31,88	0,50	0,00	32,00 ± 5,65
		Pb	8	61,75	36,13	1,88	0,00	38,00 ± 6,69
		CP	8	18,38	71,88	8,13	0,38	82,29 ± 3,90*#
	96h	CN	8	77,13	22,88	0,00	0,00	22,80 ± 4,26
		Pb	5	47,40	49,20	3,40	0,00	49,60 ± 3,67*
		CP	7	9,86	68,86	20,14	1,14	90,14 ± 2,20*#
Brânquia	6h	CN	8	60,13	39,38	0,50	0,00	39,75 ± 4,55
		Pb	8	52,13	46,13	1,75	0,00	47,75 ± 6,76
		CP	8	42,75	52,25	5,50	0,00	60,86 ± 3,83
	24h	CN	10	83,00	37,63	4,00	0,13	33,30 ± 1,71
		Pb	9	53,11	40,22	6,33	0,56	47,11 ± 6,31*
		CP	8	51,63	44,00	4,25	0,13	48,38 ± 3,88
	96h	CN	8	79,38	19,63	0,13	0,00	19,75 ± 2,09
		Pb	6	73,60	43,40	2,60	0,20	39,00 ± 5,36*
		CP	7	57,00	38,00	4,71	0,14	45,83 ± 4,87*
Fígado	6h	CN	6	51,67	47,83	0,50	0,00	48,00 ± 2,74
		Pb	5	42,80	57,00	0,20	0,00	57,20 ± 4,48
		CP	7	53,29	42,29	4,43	0,00	46,71 ± 2,02
	24h	CN	9	59,78	39,89	0,33	0,00	40,22 ± 5,67
		Pb	8	49,13	49,63	1,50	0,00	51,13 ± 6,30
		CP	7	37,71	56,57	5,57	0,14	62,14 ± 2,69*
	96h	CN	8	73,13	23,63	0,00	0,00	23,63 ± 3,06
		Pb	5	39,00	57,80	4,00	0,00	61,80 ± 5,07*
		CP	7	37,14	46,43	14,00	1,00	61,43 ± 5,80*

*diferença do respectivo CN; # diferença do respectivo Pb.

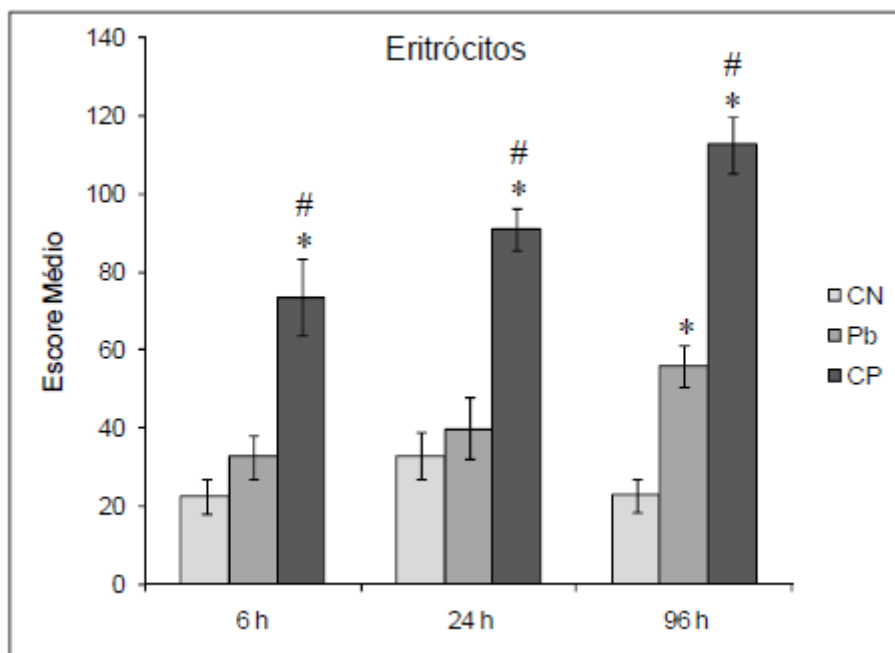


Figura 1 – Escores de danos no DNA, obtidos pelo ensaio do cometa, para eritrócitos de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo CN, # indica diferença significativa em relação ao Pb.

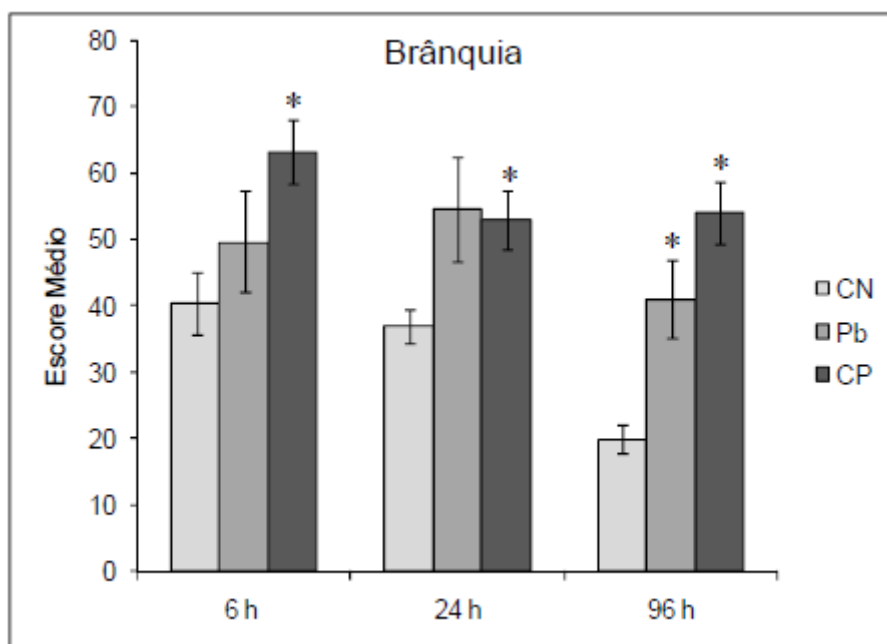


Figura 2 – Escores de danos no DNA, obtidos pelo ensaio do cometa, para células de brânquias de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo CN.

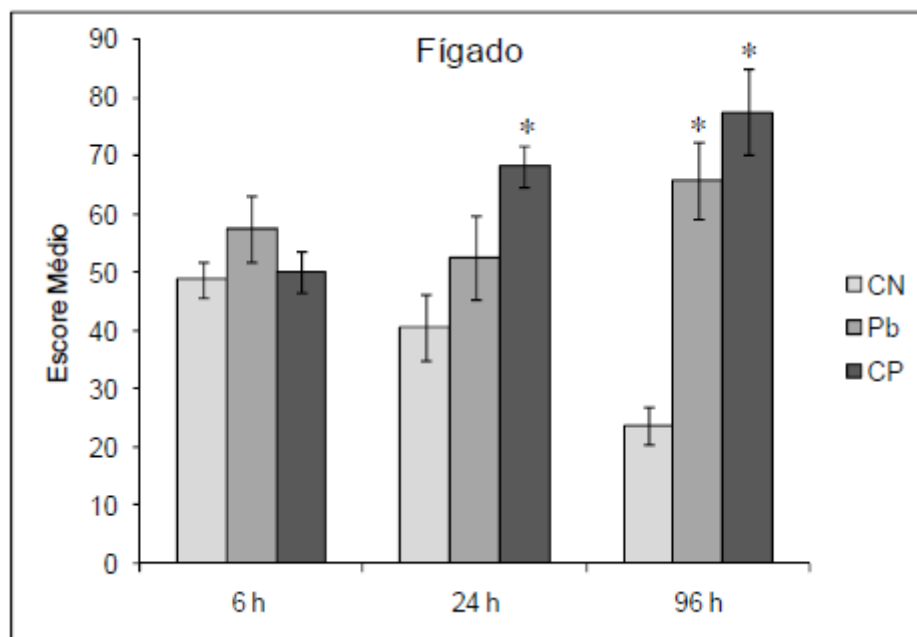


Figura 3 – Escores de danos no DNA, obtidos pelo ensaio do cometa, para células do fígado de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo CN.

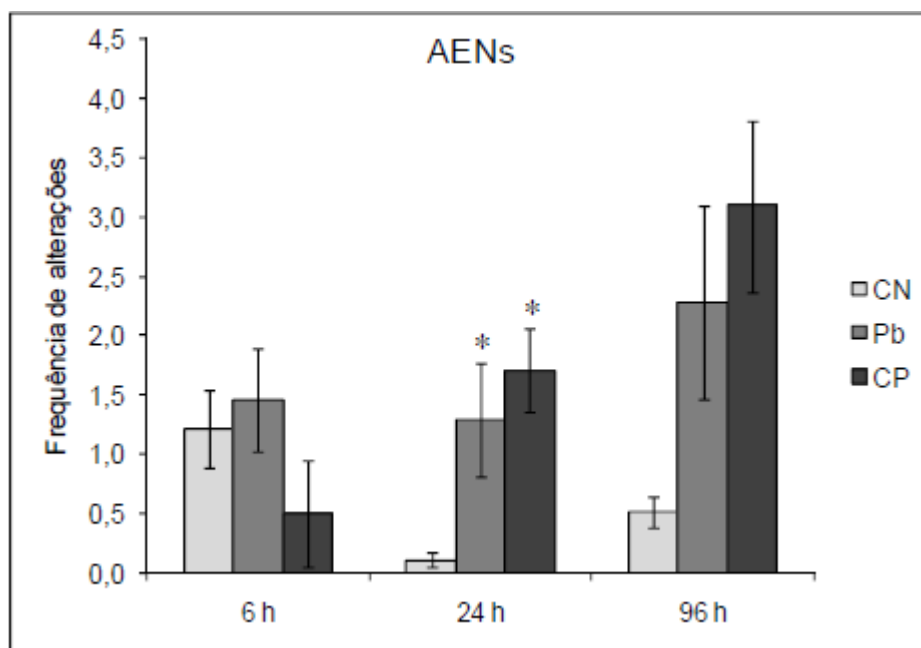


Figura 4 – Frequência de ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares em *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após os tempos de exposição de 6, 24 e 96 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferenças significativas em relação ao respectivo CN.

Tabela 2 – Frequência média de ocorrência (para cada 1000 eritrócitos analisados) de micronúcleos e das alterações eritrocíticas nucleares nos peixes do grupo controle negativo (CN), chumbo (Pb) e controle positivo (CP), após 6, 24 e 96 h de exposição. N=número de animais analisados.

Alterações	Tempo	Tratamento	N	Número total da alteração	Frequência média de ocorrência (%)
Micronúcleo	6h	CN	9	0	0
		Pb	8	0	0
		CP	8	0	0
	24h	CN	9	1	0,04 ± 0,04
		Pb	9	4	0,14 ± 0,06
		CP	7	2	0,10 ± 0,25
	96h	CN	8	1	0,04 ± 0,04
		Pb	6	2	0,11 ± 0,07
		CP	7	3	0,14 ± 0,10
Núcleo em constrição	6h	CN	9	20	0,74 ± 0,25
		Pb	8	12	0,50 ± 0,11
		CP	8	15	0,33 ± 0,25
	24h	CN	9	1	0,04 ± 0,04
		Pb	9	15	0,33 ± 0,15
		CP	7	20	0,95 ± 0,22
	96h	CN	8	12	0,44 ± 0,14
		Pb	6	27	1,50 ± 0,41*
		CP	7	43	2,05 ± 0,41*
Núcleo segmentado	6h	CN	9	4	0,15 ± 0,10
		Pb	8	4	0,17 ± 0,11
		CP	8	5	0,21 ± 0,21
	24h	CN	9	0	0
		Pb	9	5	0,24 ± 0,15
		CP	7	4	0,19 ± 0,07
	96h	CN	8	0	0
		Pb	6	8	0,44 ± 0,38
		CP	7	21	1,00 ± 0,31*
Núcleo lobulado	6h	CN	9	9	0,33 ± 0,19
		Pb	8	20	0,83 ± 0,34
		CP	8	5	0,33 ± 0,06
	24h	CN	9	1	0,04 ± 0,04
		Pb	9	18	0,71 ± 0,30*
		CP	7	12	0,57 ± 0,14*
	96h	CN	8	3	0,11 ± 0,08
		Pb	6	6	0,33 ± 0,17
		CP	7	1	0,05 ± 0,05

*diferente do respectivo CN.

Tabela 3 – Frequência relativa de nucleóides (%) observados em cada uma das classes de cometa e média de nucleóides danificados em eritrócitos de *P. lineatus* expostos in vitro ao chumbo (Pb) ou apenas em PBS (CN) após 1, 3 e 6 h. N = número de animais analisados.

Tecido	Tempo	Grupo	N	Classe de danos				Nucleóides danificados (Média ± EP)
				0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Sangue	1h	CN	6	69,00	31,00	0,00	0,00	31,00 ± 7,08
		Pb	6	30,60	68,00	2,67	0,00	70,67 ± 7,37*
	3h	CN	6	64,50	35,50	0,00	0,00	35,50 ± 10,64
		Pb	6	17,67	76,33	7,00	0,00	86,00 ± 3,82*
	6h	CN	6	75,67	24,33	0,00	0,00	24,33 ± 4,19
		Pb	6	12,33	69,67	16,33	1,33	87,33 ± 3,02*

diferença do respectivo CN.

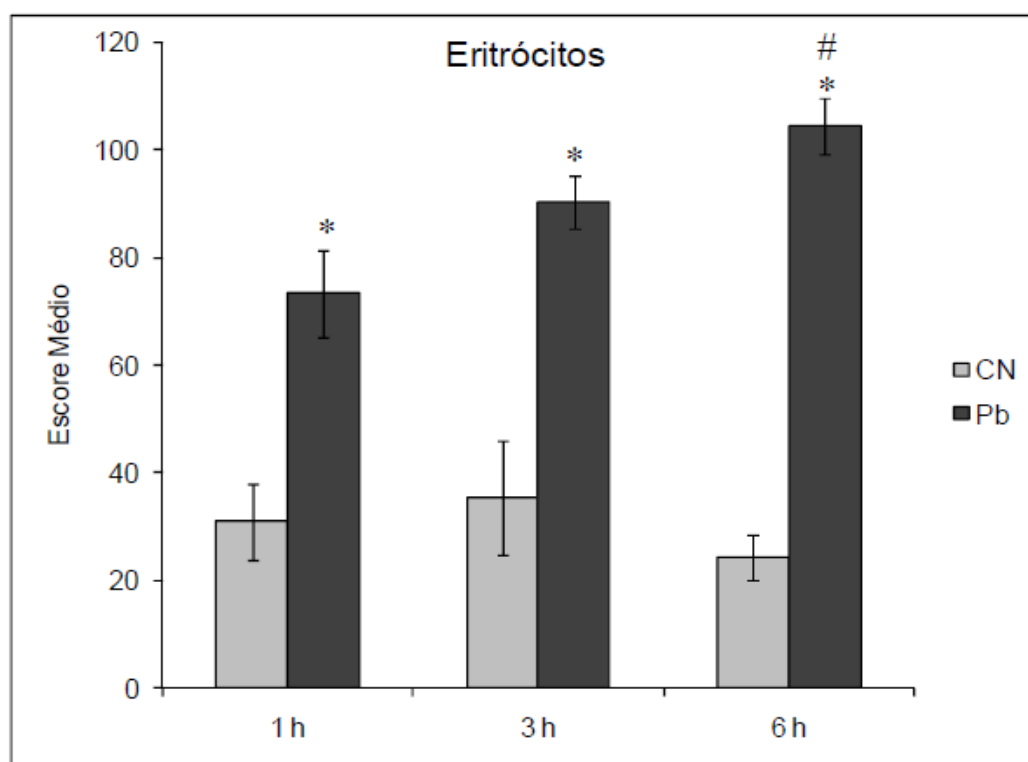


Figura 5 – Escores de danos no DNA, obtidos pelo ensaio do cometa in vitro, em eritrócitos de *P. lineatus* dos grupos controle negativo (CN) e experimental (Pb), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * indica diferença significativa em relação ao respectivo CN e # indica a diferença significativa entre os grupos Pb.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, os testes de toxicidade para avaliação do potencial genotóxico do chumbo foram realizados utilizando-se uma concentração de chumbo total de $2,1 \text{ mg Pb. L}^{-1}$, correspondente a $0,48 \text{ mg.L}^{-1}$ de chumbo dissolvido. Apesar de ser uma concentração que está acima do limite determinado na legislação brasileira, esta quantidade de chumbo já foi detectada em corpos de água localizados próximos a uma fábrica de baterias, em Londrina, cidade localizada no sul do Brasil [11].

Em peixes, um tecido freqüentemente escolhido para se realizar o ensaio do cometa é o sangue, em virtude da facilidade de coleta e de não existir a necessidade de uma etapa de isolamento das células [36]. Entretanto, diferentes tecidos podem acumular metais pesados em diferentes graus, dependendo de suas características bioquímicas [65]. Assim a escolha dos tecidos para o ensaio do cometa também deve estar relacionada com a sua capacidade de captação e metabolização de xenobióticos. No presente trabalho a escolha das células de brânquia e de fígado deve-se ao fato de as primeiras estarem em contato direto com a água e, conseqüentemente, aos poluentes nela presentes, e as de fígado por fazerem parte de um importante órgão de metabolização [36]. Entretanto, para que se possa aplicar o teste cometa de forma segura utilizando-se células de tecidos é necessário o uso de uma técnica de isolamento das células que não cause injúrias no DNA das mesmas [66].

O ensaio cometa em condições alcalinas [60] é capaz de detectar danos na molécula de DNA, quebras de fita dupla, sítios álcali-lábeis [33] e reparação incompleta de excisões [67]. Este ensaio tem sido amplamente utilizado no campo da genética toxicologia ambiental para o biomonitoramento de ambientes aquáticos [28, 33, 68] e como ferramenta para medir a relação entre o dano na molécula de DNA e a exposição de organismos a poluentes tóxicos. Embora o ensaio do cometa seja um teste amplamente utilizado e adequado para a avaliação dos danos genotóxicos em células eucarióticas nucleadas [69], o pré-requisito de isolamento de células para a aplicação desta técnica pode constituir uma limitação prática para o seu uso [68]. No presente trabalho, apesar da dificuldade metodológica imposta pelo estudo de células de órgãos como brânquias e fígado, o teste com azul de Trypan mostrou uma viabilidade celular maior que 80% para as células isoladas destes dois órgãos, confirmando assim a eficiência dos procedimentos metodológicos utilizados.

Os grupos controle negativo para brânquia e fígado apresentaram frequência de nucleóides relativamente maiores que do sangue (Tabela 1), isto se deve possivelmente ao

estresse mecânico inevitável durante o processo de dissociação celular. Os resultados do ensaio do cometa obtidos para os peixes expostos aos testes de toxicidade in vivo mostraram que o chumbo foi genotóxico para os três tecidos analisados (sangue, brânquia e fígado), somente no tempo de 96 h (Figuras 1, 2, 3). Entretanto, a frequência de nucleóides danificados de classe 1, foi maior do que de classe 2 e 3, nos três tecidos analisados, indicando que a maior parte dos danos genotóxicos promovidos pelo chumbo é passível de reparo (Tabela 1).

A ocorrência de quebras na molécula do DNA somente após 96 h de exposição ao chumbo pode estar relacionada com as defesas dos organismos. Uma das defesas mais conhecidas contra os efeitos dos metais são as metalotioneínas (MT). Estas proteínas citosólicas, de baixo peso molecular (6 a 7 kDa) tem a capacidade de se ligar a vários cátions metálicos devido a uma grande quantidade de resíduos de cisteína [70]. Assim, as MT desempenham uma importante função na detoxificação de metais pesados. Entretanto, se a quantidade de metal suplantar a capacidade de neutralização das MT de se ligar a estes metais, vai ocorrer um aumento de metal se ligando a outros compostos intracelulares [71].

A via de entrada do chumbo nas células ainda não é bem conhecida. [72] et al. trabalhando com teleósteos dulcícolas, mostraram que o Pb compete com o Ca^{+2} pelos canais de cálcio no domínio apical das células branquiais e que, portanto, estes canais seriam a via, ou uma das vias de entrada do Pb para dentro do peixe. Uma vez atravessadas as brânquias, o Pb poderia atingir a circulação sistêmica e entrar nas células pelos mesmos mecanismos de transporte de cálcio [73]. No interior das células o chumbo, assim como outros metais, pode se ligar às MT, neutralizando a capacidade do metal de exercer seus efeitos tóxicos [74]. No presente trabalho pode-se supor que nos tempos de 6 e 24 h haveria MT suficiente para se ligar ao Pb que já tivesse entrado no organismo; entretanto, a partir de 96 h a quantidade de Pb incorporada pelo peixe talvez já tenha excedido a capacidade de neutralização da MT. Entre 6 e 24 h o próprio metal pode ter ativado a expressão de MT. Segundo [75] o sequestro de metais pela MT não é um sistema estático e um aumento na taxa de síntese da MT pode ser determinado pelo aumento nos níveis de metais no organismo. A super exposição a metais pesados pode levar à superprodução de MT [76-78]. Assim, o aumento do tempo de exposição do animal ao chumbo pode ter aumentado a síntese de MT, mas no tempo de 96 h esse aumento de MT não deve ter sido o suficiente para diminuir o acúmulo de chumbo dentro da célula. [66] et al. observaram um aumento de acúmulo de

chumbo em brânquia e fígado de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) após a exposição por 72 h a uma concentração de $0,1 \text{ mg de chumbo.L}^{-1}$.

E como o Pb estaria exercendo seu efeito genotóxico após 96 h de exposição? É sabido que a elevação da concentração de íons metálicos nas células pode aumentar a concentração do metal em determinados compartimentos celulares que são freqüentemente sítios de toxicidade [74]. Por exemplo, os metais podem atuar na membrana da mitocôndria, se ligando a enzimas e proteínas da cadeia respiratória e interferindo no processo de respiração celular e causando danos oxidativos, através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs podem agir na membrana plasmática, causando peroxidação lipídica, ou diretamente na molécula de DNA, causando danos [79].

O acúmulo de metal causa um grande aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxil, que levam ao estresse oxidativo em peixe [80, 81, 82]. Embora os organismos possuam um sistema de defesa antioxidante para proteger os tecidos contra lesões oxidativas, se a velocidade de produção de EROS exceder a capacidade dos mecanismos de defesa, pode ocorrer lesão nas células e no DNA [83], induzindo danos em suas bases, causando quebras na fita de DNA [84]. [85] confirmam a possível produção de espécies reativas de oxigênio pelo chumbo induzindo toxicidade. Outro estudo realizado por [86] mostrou que metais como o cobre, cromo e vanádio levam a produção de espécies reativas de oxigênio.

Durante o estresse oxidativo as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pelas células promovem oxidação de lipídios e proteínas de membranas, bem como no DNA [21]. Estes autores sugerem que o chumbo tem o potencial de induzir estresse oxidativo e danos no DNA em concentrações muito baixas ($0,2 \text{ mg Pb.L}^{-1}$). A toxicidade do chumbo também foi associada com estresse oxidativo por [19] et al. [87] et al. também encontraram danos na molécula de DNA de células de hepatopâncreas de *Misgurnus anguillicaudatus*, um peixe da família Cipriniforme. Além de alguns trabalhos realizados com peixes, [88] et al. também observaram a genotoxicidade do chumbo, utilizando o ensaio do cometa, em ratos. Outra possível ação prejudicial do Pb poderia acontecer quando o metal interage com os processos de reparo do DNA [84].

O teste do micronúcleo com peixes tem se mostrado uma técnica experimental útil para a avaliação da genotoxicidade e com potencial para o monitoramento da qualidade da água [43, 47-48]. Este teste é baseado em fragmentos cromossômicos resultantes de danos na molécula de DNA ou de cromossomos inteiros que não são

reincorporados nos núcleos das células filhas e são transformados em pequenos núcleos ou micronúcleos [41, 45]. Para a detecção destes MNs é necessário que a população de células passe por pelo menos um ciclo celular [40]. Os micronúcleos podem ser gerados por agentes clastogênicos, que são aqueles que quebram cromossomos, ou aneugênicos, aqueles que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal [89]. Neste trabalho não foi observado aumento na ocorrência de micronúcleos nos três tempos experimentais, indicando que o chumbo, na concentração utilizada, não produziu efeitos clastogênicos ou aneugênicos para a espécie *P. lineatus*.

De acordo com a literatura, os eritrócitos micronucleados em peixes ocorrem de 1 a 5 dias após a exposição a agentes aneugênicos ou clastogênicos [40]. Assim, não era esperado o aparecimento de micronúcleo nas primeiras 6 h de exposição ao Pb. Entretanto, se o Pb tivesse efeito aneugênico e/ ou clastogênico, a partir do tempo de 24 h e principalmente após 96 h já era esperado que aparecessem eritrócitos MN, mas isso não ocorreu. Em um trabalho realizado com carpas, *Cyprinus carpio* expostas a $2,0 \text{ mg. L}^{-1}$ de mercúrio, durante 90 dias, também não foi verificado aumento significativo na frequência de micronúcleo [49]. Indução de ocorrência de eritrócitos com micronúcleos também não foi observada para outros compostos químicos. [90] et al. também não encontraram aumento de MN em hemácias de *P. lineatus* expostos a uma concentração subletal do herbicida Roundup® por 96 h. Estes exemplos também podem ilustrar uma baixa sensibilidade do teste do micronúcleo para peixes, que por sua vez poderia estar relacionada à frequência de ocorrência muito reduzida de células micronucleadas em peixes [63]. Em função disto, atualmente a ocorrência de outros tipos de AENs tem sido muito utilizada como uma ferramenta para quantificar alterações nucleares.

As anormalidades eritrocíticas nucleares (AENs) foram descritas primeiramente por [63] et al. e as anormalidades foram classificadas em: núcleo lobulado, núcleo segmentado e núcleo em constrição. Os mecanismos de formação destas anormalidades nucleares ainda não são totalmente compreendidos [91]. Estas alterações da morfologia nuclear já foram consideradas de origem genotóxica por alguns autores [48, 91-95]. Os resultados obtidos a partir da análise das AENs nos eritrócitos dos peixes expostos ao Pb mostraram um aumento significativo para o tempo de 24 h, e uma clara tendência de aumento após 96 h, em relação ao grupo controle negativo. O aparecimento dessas anormalidades pode estar relacionado com o processo de apoptose na célula [96]. [97] et al.,

já observaram um aumento na frequência de anormalidades nucleares em tilápias, *Oreochromis niloticus*, coletadas em locais contaminados com cromo.

A ciclofosfamida (CF) é comprovadamente um agente alquilante indireto, amplamente utilizado em muitos sistemas-teste [98]. No presente estudo os resultados do ensaio do cometa mostraram um aumento significativo no escore de danos, nos tecidos dos peixes injetados com CF, nos três tempos experimentais, exceto no fígado no tempo de exposição de 6 h. [90] et al. também observaram um aumento significativo de danos no DNA, pelo teste do cometa, em *P. lineatus* injetados com CF. Entretanto, considerando-se apenas o total de nucleóides danificados, a eficiência do controle positivo variou de acordo com o órgão estudado, mostrando que a CF se apresentou como um bom controle positivo para o sangue, mas não tão eficiente para as brânquias e fígado.

A ciclofosfamida também é frequentemente utilizada como controle positivo em teste de micronúcleo devido ao seu potencial clastogênico [50, 94, 99-102]. [103] observaram aumento significativo na ocorrência de MN em eritrócitos da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, após administração intraperitoneal de ciclofosfamida. Entretanto, no nosso trabalho não foi verificado o aumento da frequência de MN nos eritrócitos dos peixes do CP, em nenhum tempo experimental. Este resultado corrobora com o encontrado por [91] quando analisaram células de rim cefálico de *Phoxinus phoxinus* injetados intraperitonealmente com CF. Por outro lado, os resultados da ocorrência de AENs após a aplicação de CF mostrou um aumento significativo após 24 h, e uma tendência ao aumento após 96 h de exposição. Outros trabalhos também já mostraram um aumento na frequência de ocorrência de AENs em células de peixes expostos a ciclofosfamida, colchicina e mitomicina C [91; 103].

Os resultados do ensaio do cometa, realizados com eritrócitos expostos in vitro ao chumbo, confirmaram o efeito genotóxico do chumbo desde a primeira hora de exposição, e mostraram que os danos no DNA aumentaram com o aumento do tempo de exposição. A frequência de nucleóides danificados de classe 2 no tempo de 6 h foi bastante expressiva em relação ao de 1 e 3 h, além disso, também apresentou danos de classe 3, que não foi observado nos tempos de 1 e 3 h (Tabela 3). Neste caso a entrada de metal na célula deve gerar EROs, que vão agir diretamente na molécula de DNA. Tem sido mostrado também que as EROs podem promover a desestabilização da membrana dos lisossomos, que se rompem, liberando uma grande quantidade de endonucleases que irão agir na molécula de DNA causando quebras [21].

Concluindo, podemos afirmar que tanto nos testes in vivo quanto in vitro, o chumbo se mostrou genotóxico para o *P. lineatus*, promovendo fragmentação do DNA. O efeito genotóxico do metal deve ser indireto, provavelmente decorrente da ação de espécies reativas de oxigênio sobre o DNA. A ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares também reforça a idéia da toxicidade do chumbo estar sendo exercida pela produção de EROS, que também podem ser responsáveis pelo processo de apoptose nos eritrócitos. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar se as lesões no DNA provocadas pelo chumbo têm de fato origem oxidativa.

REFERÊNCIAS

- [1] F.R. Moreira, J.C. Moreira, Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde, *Rev. Panam. Salud. Públ.* 15(2004), 119–29.
- [2] M.Z. Barciszewska, M. Szymanski, E. Wyszko, J. Pas, L. Rychlewski, J. Barciszewski, Lead toxicity through the leadzyme, *Mutat. Res.* 589(2005), 103-110.
- [3] M.M.B. Paoliello, A.A.M. Chasin, *Ecotoxicologia do Chumbo e seus compostos*, Caderno de referência ambiental, v.3. Salvador Bahia. 2001.
- [4] M.I. Castro-González, M. Méndez-Armenta, Heavy metals: Implications associated to fish consumption, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2008), doi:10.1016/j.etap.2008.06.001.
- [5] M. Valverde, T.I. Fourtol, F. Diaz-Barriga, J. Mejía, E.R. Castillo, Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response, *Mutatesis* 17(2002), 55-61.
- [6] Fracasso, M.,E.; Perbellini, L.; Soldà, S.; Talamini, G.; Franceschetti, P. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C, *Mutat. Res.* 515 (2002), 159-169.
- [7] ATSDR (Agency for Toxic Substance and Disease Registry), 2005. Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centres for Diseases Control, Atlanta, GA. In: M.I. Castro-González, M. Méndez-

- Armenta, Heavy metals: Implications associated to fish consumption, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2008), doi:10.1016/j.etap.2008.06.001.
- [8] ATSDR. Toxicological profile for lead. Publ no PB 93-182475. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, GA. 1993. In: K. Danadevi, R.B. Roy, P. Saleha Banu, R. Hanumanth, G. Paramjit, *Toxicol.* 187(2003), 183-19.
- [9] K. DANADEVI, R. ROZATI, S.B. BANU, H.P. RAO, P. GROVER, DNA damage in workers exposed to lead using comet assay, *Toxicol.* 187(2003), 183-193.
- [10] D.J. Pain, Lead in the environment. In: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Jr. Burton, J.Jr. Cairns, (Eds) *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, (1995) p. 356-391.
- [11] M.J.S. Yabe, E.O. Oliveira, Metais Pesados em Águas Superficiais como Estratégia de Caracterização de Bacias Hidrográficas, *Química Nova*, 21 ,(1998), 551-556.
- [12] J.S. Almeida, P.C. Meletti, C.B.R. Martinez, Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Comp. Biochem. Physiol.* 140C(2005), 356-363.
- [13] E. Courtois, M. Marques, A. Barrientos, Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(2003), 1464–1470.
- [14] G.B. Gerber, A. Léonard, P. Jacquet, Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead, *Mutat. Res.* 76(1980), 115-141.
- [15] H.A Tajmir-Riahi, M. A. Naoui, R. Ahmad, The effects of Cu and Pb on the solution structure of calf thymus DNA. DNA condensation and denaturation studies by Fourier Transform IR difference spectroscopy, *Biopolymers*, 33(1993), 1819-1827.
- [16] F.M. Johnson, The genetic effects of environmental lead, *Mutat. Res.* 410(1998), 123–140.

- [17] D.C. Tanner, M.M. Lipsky, (1984) Effects of lead acetate on N-(49-fluoro-4-biphenyl) acetamid-induced renal carcinogenesis. In: Y. Duydu, H. S. Süzen, A. Aydin, O. Cander, H. Uysal, A. Isimer, N. Vural, Environ. Contam.Toxicol. 41(2001), 241–246.
- [18] Y. Hiraku, S. Kawanishi, Mechanism of oxidative DNA damage induced by aminolevulinic acid in the presence of copper ion, Cancer Res. 56(1996), 1786–1793.
- [19] D. Prá, T. Guecheva, S. I. R. Franke, T. Knakievicz, B. P. Erdtmann, J. A. Henriques, Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos, J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 1(2006), p. 171-175.
- [20] Y. Zhang, D. Huang, D. Zhao, J. Long, G. Song, A. LI, Long-term toxicity effects of cadmium and lead on Bufo raddei Tadpoles, Bull. Environ. Contam.Toxicol. 79(2007), 178–183.
- [21] M.-Z. Wang, X.-Y. Jia, Low levels of lead exposure induce oxidative damage and DNA damage in the testes of the frog Rana nigromaculata, Ecotoxicology, 2008, DOI 10.1007/s10646-008-0262-5.
- [22] M.N. Rabello-Gay, M.A.R. Rodríguez, R. Monteleone-Neto, Testes com organismos superiores. In: Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, Genet. Mol. Biol., (1991), 59-75.
- [23] L.R. Shugart, Environmental genotoxicology. In: G.M. Rand, Fundamentals of Aquatic Toxicology. 2^{ed}. Washington: Taylor & Francis, 1995.
- [24] L.R. Ribeiro, E.K. Marques, A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, E.K. Marques, (Orgs.). Mutagênese Ambiental, Canoas: Ulbra, p. 21-28, 2003.
- [25] A. Bucker, W. Carvalho, J.A. Alves-Gomes, Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em Eigenmannia virescens (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. Acta Amaz, 36(2006), 357-364.

- [26] C. Betti, T. Davini, L. Giannessi, N. Loprieno, R. Barale, Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subject, *Mutat. Res.* 343(1995), 201-207.
- [27] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, Y. F. Sasaki, Single cell gel / cometa assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35(2000), 206-221.
- [28] R. F. Lee, S. Steinert, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutat. Res.* 544(2003), 43-64.
- [29] A.R. Collins, The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004), 249-262.
- [30] N.G. Lemos, A.L. Dias, A.T. Silva-Souza, M.S. Mantovani, Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*, *Environ. Toxicol. Phar.* 19(2005), 197-201.
- [31] G. Frenzilli, et al., The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments, *Mutat. Res.* 2008, doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001
- [32] D.W. Fairbairn, P.L. Olive, K.L. O'Neill, The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339(1995), 37-59.
- [33] R. Tice, The Single Cell/ Cometa Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: D.H.; Philips, Vennit, S. (Eds.). *Environmental Mutagenesis*. Bio Scienific Publishers Ltd. Oxford, UK; (1995), 315-339.
- [34] D.K. Monteith, J. Vanstone, Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage, *Mutat. Res.* 345(995), 97-103.
- [35] A.R. Collins, M. Dusinska, M. Franklin, M. Somorovska, H. Petrovska, S. Duthie, M. Panayiotidis, K. Raslova, N. Vaughan, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications, *Environ. Mol. Mutagen.* 30(1997), 139-146.

- [36] M.F. Kilemade, M.G.J. Hartl, D. Sheehan, C. Mothersill, F.N.A.M. Van Pelt, J. O'halloran, N.M. O'brien, Genotoxicity of Field-Collected Inter-tidal Sediments From Cork Harbor, Ireland, to Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as Measured by the Comet Assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 44(2004), 56-64.
- [37] G.B. Kim, R.F. Lee, K.A. Maruya, K.L. Smalling, The importance of unwinding buffer pH when determining effects of toxicants on DNA in fish blood cells, Abstracts from the 21st Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, (2000), 225.
- [38] A.N. Jha, Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 23(2008), 207–221.
- [39] A. Dhawan, M. Bajpayee, D. Parmar, Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models, *Cell. Biol. Toxicol.* 25(2009), 5-32.
- [40] I. Udroi, The micronucleus test in piscine erythrocytes, *Aquat. Toxicol.* 79(2006), 201–204.
- [41] D. Jenssen, C. Ramel, The micronucleus test as a part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested, *Mutat. Res.* 75(1980), 191–202.
- [42] J. A. Heddle, M. Hite, B. Jrkhart, J. T. Macgregor, M. F.Salamone, The Indution of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutat. Res.* 123(1983), 61-118.
- [43] K. Al-Sabti , C. D. Metcalfe, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat. Res.* 343(1995), 121-135.
- [44] D.J. Tucker, R. Julian-Preston, Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment, *Mutat. Res.* 365(1996), 147-159.
- [45] C.K. Grisolia, A comparison between mouse and fish micronucelus test using cyclophosphamide, mitomycin C, and various pesticides, *Mutat. Res.* 518(2002), 145–150.

- [46] C. K. Grisolia, F. L.R.M. Starling, Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat. Res.* 491(2001), 39–44.
- [47] S. Minissi, E. Ciccotti, M. Rizzoni, Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater, *Mutat. Res.* 367(1996), 245–251.
- [48] S. Sanchez-Galan, A.R. Linde, J.I. Izquierdo, E. Garcia-Vazquez, Micronuclei and fluctuating asymmetry in Brown trout *Salmo trutta* : complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems, *Mutat. Res.* 412(1998), 219–225.
- [49] J.C. Nepomuceno, I. Ferrari, M.A. Spano, A.J. Centeno, Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury, *Environ. Mol. Mutagen.* 30(1997), 293–297.
- [50] M.A. Campana, A.M. Panzeri, V.J. Moreno, F.N. Dulout, Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish. *Cheirodon interruptus interruptus*, *Mutat. Res.* 438(1999), 155–161.
- [51] F.E. Matsumoto, I.M.S. Cólus, Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characide) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate, *Genet. Mol. Biol.* 23(2000), 489-492.
- [52] M.M. Cestari, P.M.M. Lemos, C.A.O. Ribeiro, J.R.M.A. Costa, E. Pelletier, M.V.M. Ferraro, M.S. Mantovani, Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as releaved by the comet assay and cromossomal aberrations, *Genet. Mol. Biol.* 27(2004), 270-274.
- [53] C.B.R. Martinez, I.M.S. Cólus, Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: M. E. Medri, E. Bianchini, O. A. Shibatta, J. A. Pimenta, A bacia do Rio Tibagi. Londrina, cap. 22(2002), 403-423.

- [54] M.M.P. Camargo, C.B.R. Martinez, Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21(2006), 61-69.
- [55] C.B.R. Martinez, M. Y. Nagae, C.T.B. Zaia, D.M.A. Zaia, Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64(2004), 797-807.
- [56] J.D. Simonato, A.C. Albinati, C.B.R. Martinez, Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76(2006), 505-511.
- [57] T.P. Vanzella, C.B.R. Martinez, I.M.S. Cólus, Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species, *Mutat. Res.* 631(2007), 36-43.
- [58] C.C.C. Cerqueira, M.N. Fernandes, Gill fish recovery after cooper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52(2002), 83-91.
- [59] L.G. Costa, E. Hodgson, D.A. Lawrence, D.J. Reed, W.F. Greenlee, *Current Protocols in Toxicology*. Jonh Wiley & Sons, Inc., Washington. (2005).
- [60] N.P. Singh, M.T. Mccoy, R. R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell. Res.* 175(1998), 184-191-336.
- [61] G. Speit, A. Hartmann, The comet assay (single cell gel test) - a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair, in: D.S. Henderson (Ed.), *Methods in Molecular Biology* 113, DNA-repair Protocols: Eukaryotic Systems, Human Press Inc., Totowa, NY, (1999), 203-212.
- [62] R.N. Hooftman, W.K. Raat, Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate, *Mutat. Res.* 104(1982), 147-152.

- [63] K.R. Carrasco, K.L. Tilbury, M.S. Myers, Assessment of the piscine micronucleus test as an *situ* biological indicator of chemical contaminant effects, *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 47(1990), 2123-2136.
- [64] J.H. Zar, *Biostatistical analysis*. 3rd ed. McElroy, W. D.; Swanson, C. P (eds.). New Jersey, USA, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, (1996), 662.
- [65] M. Suiçmez, M. Kayim, D. Köseoglu, E. Hasdemir, Toxic Effects of Lead on the Liver and Gills of *Oncorhynchus mykiss* WALBAUM 1792, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77(2006), 551–558.
- [66] Y. Miyamae, M. Yamamoto, Y. F. Sasaki, H. Kobayashi, M. Igarashi-Soga, K. Shimoi, M. Hayashi, Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories, *Mutat. Res.* 418(1998), 131-140.
- [67] C.M. Gedik, S.W.B. Ewen, A.R. Collins, Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Rad. Biol.* 62(1992), 313-320.
- [68] C.L. Mitchelmore, J.K. Chipman, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.* 399(1998), 135–147.
- [69] S. Sharma, N. S. Nagpure, R. Kumar, S. Pandey, S. K. Srivastava, P. J. Singh, P. K. Mathur, Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus*, using the comet assay, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53(2007), 617-623.
- [70] M. Nordberg, Metallothioneins: historical review and state of knowledge, *Talanta*, 46(1998.), 243–254.
- [71] G. Roesijadi, Metallothionein and Its Role in Toxic Metal Regulation, *Comp. Biochem. Physiol.* 113C(2)(1996), 117-123.

- [72] A. Macdonald, L. Silk, M. Schwartz, R. C. Playle, A lead gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Comp. Biochem. Physiol.* 133C(2002), 227-242.
- [73] J. T. Rogers, C. M. Wood, Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *J. Exp. Biol.* 207(2004), 813-825.
- [74] R.T. Di Giulio, W.H. Benson, B.M. Sanders, P.A. Van Veld, Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. IN: M. Gary, P. D. Rand, *Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate, and risk assessment*. 2^a edição, (1995), 545-548.
- [75] C. Hogstrand, C. Haux, Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein, *Comp. Biochem. Physiol.* 100(1991), 137–141.
- [76] S. Petrovic, B. Ozretic, M. Krajnovic-Ozretic, D. Bobinac, Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study, *Mar. Pollut. Bull.* 42(2001), 1373-1378.
- [77] M. Cavaletto, A. Ghezzi, B. Burlando, V. Evangelisti, N. Ceratto, A. Viarengo, Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*, *Comp. Biochem. Physiol.* 131C(2002), 447-455.
- [78] A.H. Ringwood, J. Hoguet, C. Keppler, M. Gielazyn, Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters - *Crassostrea virginica*, *Mar. Environ. Res.* 58(2004), 151-155.
- [79] I. Ahmad, V.L. Maria, M. Oliveira, M. Pacheco, M.A. Santos, Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone, *Mutat. Res.* 608(2006), 16–28.
- [80] A.A.R. Radi, B. Matkovics, Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues, *Comp. Biochem. Physiol.* 90(1988), 69-72.

- [81] H. Roche, G. Boge, Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities in vitro of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*, *Toxicol. Vitro*, 7(1993), 623-629.
- [82] C. Dautremepuits, S. Paris-Palacios, S. Betoulle, G. VERNET, Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan *Comp. Biochem. Physiol.* 137(2004), 325-333.
- [83] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J. Luc Ravanat, Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutat. Res.* 531(2003), 5–23.
- [84] S. A. Reinecke, A. J. Reinecke , The Comet Assay as Biomarker of Heavy Metal Genotoxicity in Earthworms, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46(2004), 208–215.
- [85] H. Gurer, N. Ercal, Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Rad. Biol. Med.* 29(11)(2004), 927-945.
- [86] S.J. Stohs, D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Rad. Biol. Med.* 18(1995), 321–336.
- [87] Y. Zhang, Y. Wang, R. Yu, S. Zhang, Z. Wu, Effects of heavy metals Cd²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on DNA damage of loach *Misgurnus anguillicaudatus*, *Front. Biol. China*, 3(1)(2008), 50-54.
- [88] K. D. Devi, B. S. Banu, P. Grover, K. Jamil, Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay), *Toxicol.* 145(2000), 195–201.
- [89] I.V. Villela, A. Lau, J. Silveira, D. Prá, H.C. Rolla, J.D. Silveira, Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: J. Silva, B. Erdtmann, J.A.P. Henriques, *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance, cap. 7(2003), 147-163.
- [90] D.G.S.M. Cavalcante, C.B.R. Martinez, S.H. Sofia, Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*, *Mutat. Res.* 655(2008), 41–46.

- [91] F. Ayllón, E. Garcia-Vazquez, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test, *Mutat. Res.* 467(2000), 177–186.
- [92] C.D. Metcalfe, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnow (*Imbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40(1988), 489-495.
- [93] M. Pacheco, M.A. Santos, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. *Fresenius Environ. Bull.*, 5(1996), 746-751.
- [94] M. Pacheco, M.A. Santos, Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38(1997), 252-259.
- [95] M. Pacheco, M.A. Santos, Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40(1998), 71-76.
- [96] L.R. Ribeiro, D.M.F.; Salvadori, E.K. Marques, *Mutagênese Ambiental*. Editora Ulbra. Canoas: 1ª edição, (2003).
- [97] S.T. Matsumoto, M.S. Mantovani, Mirtis, I.A. Malaguttii, A.L. Dias, I.C. Fonseca, M.A. Marin-Morales, 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, *Genet. Mol. Biol.* 29(2006), 148-158.
- [98] D. Anderson, J.B. Bishop, R. Colin Garner, P. Ostrosky-Wegman, P.B. Selby, Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks, *Mutat. Res.* 330(1995), 115-181.
- [99] B.M. Miller, I.D. Adler, Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo, *Mutagenesis*, 5(4)(1990), 411-415.

- [100] A.M. Lynch, J.M. Parry, The cytochalasin-B micronucleus/ kinetochore assay in vitro: Studies with 10 suspected aneugens, *Mutat. Res.* 287(1993), 71-86.
- [101] T. Suzuki, M. Hayashi, A. Hakura, A.O. Asita, Y. Kodama, M. Honma, T. Sofuni, Combination affects of clastogens in the mouse peripheral blood micronucleus assay, *Mutagenesis*, 10(1)(1995), 31-36.
- [102] J.W. Parton, M.L. Garriott, An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using four week-old rats treated with know clastogens, *Environ. Mol. Mutagen.* 29(1997), 379-385.
- [103] F. Ayllón, E. Garcia-vazquez , Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49(2001), 221-225.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos testes de toxicidade in vivo realizados com *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo ($0,48 \text{ mg Pb dissolvido.L}^{-1}$), assim como os resultados obtidos com os eritrócitos deste peixe expostos à mesma concentração de chumbo em testes in vitro, mostraram que este metal promove danos no DNA de células de sangue, brânquias e fígado. A maior parte destes danos é passível de reparo, como indicado pelo predomínio de danos de classe 1, no teste do cometa. Apesar de sua genotoxicidade, o chumbo não produziu efeitos aneugênicos ou clastogênicos nos eritrócitos dos peixes, como indicado pela baixa presença de micronúcleos. Entretanto, a ocorrência de outras anormalidades nucleares, como núcleos segmentados, lobulados ou em forma de rim, reforça a toxicidade deste metal para as hemácias de *P. lineatus*.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLAH, G.A.; EL-FAYOUMI, R.I.; SMITH, M.J.; HECKAMANN, R.A.; O'NEILL, K.L. A comparative evaluation on aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the comet assay. **Mutation Research**, v. 446, p. 181-188, 1999.
- AHMAD, I.; MARIA, V.L.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone. **Mutation Research**, v.608, p.16–28, 2006.
- AI-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343 p.121-135, 1995.
- ALMEIDA, J.S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 140C, p. 356-363, 2005.
- ANDERSON, D.; BISHOP, J. B.; COLIN GARNER, R.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; SELBY, P. B. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. **Mutation Research**, v. 330, p. 115-181, 1995.
- ARAÚJO, E.J.A.; MORAIS, J.O.R.; SOUZA, P.R.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivípara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Acta Scientiarum** v. 23, n. 2, p. 391-399, 2001
- ATIENZAR, F.A.; JHA, A.N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. **Mutation Research**. v.613, p.76-102, 2006.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 282-287, 2007.
- ATSDR. Toxicological profile for lead. Publ no PB 93-182475. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, GA. 1993. In: DANADEVI, K.; ROYA ROZATI, B.; SALEHA BANU, P.; HANUMANATH R.; PARAMJIT G. **Toxicology**, v.187 , p.183-19, 2003.
- ATSDR (Agency for Toxic Substance and Disease Registry), 2005. Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centres for Diseases Control, Atlanta, GA. In: CASTRO-GONZÁLEZ, M.I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M., Heavy metals: Implications associated to fish consumption. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 2008, doi:10.1016/j.etap.2008.06.001.

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

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p.221-225, 2001.

BARCISZEWSKA, M.Z.; SZYMANSKI, M.; WYSZKO, E.; PAS, J.; RYCHLEWSKI, L.; BARCISZEWSKI, J. Lead toxicity through the leadzyme. **Mutation Research**, v. 589, p.103-110, 2005.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. **Mutation Research**, v. 343, p. 201-207, 1995.

BICKHAM, J. W.; SANDHU, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 463, p. 33–51, 2000.

BOLOGNESI, C.; FRENZILLI, G.; LASAGNA, C.; PERRONE, E.; ROGGERI, P. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. **Mutation Research**, v.552, p.153-162, 2004.

BOZZETTI, M.; SCHULZ, U.H. An index of biotic integrity based on fish assemblages for subtropical streams in southern Brazil. **Hydrobiologia**, v.529 p.133-144, 2004.

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

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; LUC RAVANAT, J. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, **Mutation Research**, v. 531, p. 5-23, 2003.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 61-69, 2006.

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

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, 2123-2136, 1990.

CASTRO, V. L. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos no desenvolvimento animal. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.21, p.469-497, 2004.

CASTRO-GONZÁLEZ, M.I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M., Heavy metals: Implications associated to fish consumption. **Environmental Toxicology Pharmacology** 2008, doi:10.1016/j.etap.2008.06.001.

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, v. 655, p. 41-46, 2008.

CAVALETTO, M. A.; GHEZZI, B.; BURLANDO, V.; EVANGELISTI, N.; CERATTO; VIARENGO A. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology**, v. 131, p. 447-455, 2002.

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

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

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill fish recovery after cooper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, p. 83-91: 2002.

CESTARI, M.M.; LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A.O.; COSTA, J.R.M.A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M.V.M.; MANTOVANI, M.S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as releaved by the comet assay and cromossomal aberrations. **Genetic and Molecullar Biology**, v. 27, p.270-274, 2004.

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

COLLINS, A.R.; DUSINSKA, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKA, M.; PETROVSKA, H.; DUTHIE, S.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVA, K.; VAUGHAN, N., Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, p.139-146, 1997.

COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26 (3), p.249-262, 2004.

COSTA, L.G.; HODGSON, E.; LAWRENCE, D.A.; REED, D.J.; GREENLEE, W.F. **Current Protocols in Toxicology**. Jonh Wiley & Sons, Inc., Washington. 2005.

COURTOIS, E.; MARQUES, M.; BARRIENTOS, A. Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, p.1464-1470, 2003.

DANADEVI, K.; ROZATI, R.; BANU, S.B.; RAO, H.P.; GROVER, P. DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. **Toxicology**, v.187, p. 183-193, 2003.

DAUTREMEPUITS, C.; PARIS-PALACIOS, S.; BETOULLE, S.; VERNET, G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.137, p.325-333, 2004.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cellular Biology and Toxicology**. v.25, p.5-32, 2009.

DEHON, G.; CATOIRE, L.; DUEZ, P.; BOGAERTS, P.; DUBOIS, J. Validation of an automatic comet assay analysis system integrating the curve fitting of combined comet intensity profiles. **Mutation Research**, p. 87-95, 2008.

DEVI, K. D.; BANU, B. S.; GROVER, P.; JAMIL, K. Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay) **Toxicology**, v.145, p.195-201, 2000.

DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. IN: GARY, M., RAND, P. D. Fundamentals of aquatic toxicology. **Effects, environmental fate, and risk assessment**. 2^a edição, p. 545-548, 1995.

DOMINGUES, W. M.; HAYASHI, C. Estudo experimental sobre anéis diários em escamas nas fases iniciais do desenvolvimento do curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, *Prochilodontidae*). **Revista Brasileira de Biologia**, v.58, p.609-617, 1998.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p.37-59, 1995.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**. v.600, p.58–66, 2006.

FERRARO, M.V.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; CIRO, O. R.; CESTARI, M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as

evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 103-107, 2004.

FRACASSO, M. E.; PERBELLINI, L.; SOLDÀ, S.; TALAMINI, G.; FRANCESCHETTI, P. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. **Mutation Research** v.515, p.159-169, 2002.

FRENZILLI, G. et al. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments, **Mutation Research**. 2008, doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001

GEDIK, C.M.; EWEN, S.W.B.; COLLINS, A.R. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, **International Journal of Radiation Biology**, v. 62, p. 313-320, 1992.

GERBER, G. B.; LÉONARD, A; JACQUET, P. Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. **Mutation Research**, v. 76, p. 115-141, 1980.

GONTIJO, A. M. M.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de Dan no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; M, E.K (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003, p. 247-271.

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

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

HAS-SCHÖN, E.; BOGUT, I.; STRELEC, I. Heavy metal prole in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of River Neretva (Croatia). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 545-551, 2006.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J. T.; SALAMONE, M. F. The Indution of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by aminolevulinic acid in the presence of copper ion. **Cancer Research**, v. 56, p.1786-1793, 1996.

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

HOGSTRAND, C.; HAUX, C. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.100, p.137-141, 1991.

JAGETIA, G. C.; ARUNA, R., Effect of various concentrations of lead nitrate on the induction of micronuclei in mouse bone marrow. **Mutation Research**.v.415, p.131-137. 1998.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: overview, **Mutation Research**. v. 552 p.1-17, 2004.

JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. Review. **Mutagenesis** . v.. 23 , p. 207-221, 2008

JENSSEN, D.; RAMEL, C.; The micronucleus test as a part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested, **Mutation Research**, v.75, p.191–202, 1980.

JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation Research**, v. 410, p.123-140, 1998.

JOSEPH, T. R.; CHRIS, M. W. Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p.813-825, 2004.

KALAY, Ö.A.; TAMER, M. L.; CANLI, M. Copper and Lead Accumulation in Tissues of a Freshwater Fish *Tilapia zillii* and Its Effects on the Branchial Na,K-ATPase Activity **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. (1999) 62:160-168

KILEMADE, M. F.; HARTL, M. G. J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F.N.A.M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N.M. Genotoxicity of Field-Collected Inter-tidal Sediments From Cork Harbor, Ireland, to Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as Measured by the Comet Assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p.56-64, 2004.

KIM, G. B.; LEE, R. F.; MARUYA, K. A.; SMALLING, K. L. The importance of unwinding buffer pH when determining effects of toxicants on DNA in fish blood cells, **Abstracts from the 21st Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Society of Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, FL, p. 225, 2000.

LACHER, T. E.; GOLGSTEIN, M. I. Tropical ecotoxicology: status and needs. **Enviromental Toxicology Chemical**, v.16, p. 100-111, 1997.

LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology**, v. 147, p. 222-231, 2008.

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

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

LEROY, T.; VAN HUMMELEN, P.; ANARD, D.; CASTELAIN, P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LAUWERYS, R.; LISON, D.; Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis, J. **Toxicol. Environ. Health** v.47 p.409-422, 1996.

LYNCH, A. M.; PARRY, J. M. The cytochalasin-B micronucleus/ kinetochore assay in vitro: Studies with 10 suspected aneugens. **Mutation Research**, v.287, p.71-86, 1993.

MACDONALD, A.; SILK, L.; SCHWARTZ, M.; PLAYLE, R. C. (2002). A lead gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.133C, p.227-242, 2002.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina, cap. v.22, p. 403-423, 2002.

MARTINEZ, C. B.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B.; ZAIA, D. M. A. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64. p. 797-807, 2004.

MATSUMOTO, F.E.; CÓLUS, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p. 489-492, 2000.

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

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

MILLER, B. M.; ADLER, I. D. Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo. **Mutagenesis**, v.5(4), p.411-415, 1990.

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

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v.399, p.135-147, 1998.

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

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

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Rev. Saúde Pública**, v.36 (3), p.370-4, 2002.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana Salud Publica**, v.15(2), p.119-29, 2004.

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

NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. **Talanta**, v.46, p.243-254, 1998.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W. C.; ROULEAU, C. Comparative uptake, bioaccumulation and Gill damages of inorganic Mercury in tropical nordic freshwater fish. **Environmental Research** v.83, p. 286-292, 2000.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. **Fresenius Environmental Bulletin**, v.5, p.746-751, 1996.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 38, p.252-259, 1997.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.40, p.71-76, 1998.

PAIN, D. J. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON G.A. Jr; CAIRNS J.Jr (Eds) **Handbook of Ecotoxicology**. Lewis Publishers, Boca Raton, p. 356-391, 1995.

PAOLIELLO, M. M. B.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do Chumbo e seus compostos. **Caderno de referência ambiental**, v.3. Salvador Bahia. 2001.

PARTON, J. W.; GARRIOTT, M. L. An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and in hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using four week-old rats treated with know clastogens. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.29, p.379-385, 1997.

PEREIRA MADUENHO, L.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 148, p.265-272, 2008.

PETROVIC, S. B.; OZRETIC, M.; KRAJNOVIC-OZRETIC; D. BOBINAC. Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p.1373-1378, 2001.

PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANKE, S. I. R.; KNAKIEVICZS, T.; ERDTMANN, B. & P. HENRIQUES, J. A. Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, p. 171-175, 2006.

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

RADI, A. A. R.; MATKOVICS, B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.90, p.69-72, 1988.

REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. The Comet Assay as Biomarker of Heavy Metal Genotoxicity in Earthworms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.46, p.208-215, 2004.

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

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra. Canoas: 1ª edição, 2003.

RINGWOOD, A. H. J.; HOGUET, KEPPLER, C.; GIELAZYN, M., Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters - *Crassostrea virginica*. **Marine Environmental Research**, v.58, p. 151-155, 2004.

ROCHE, H.; BOGE, G. Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities in vitro of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*. **Toxicology in Vitro**, v.7, p.623-629, 1993.

RODRIGUES, A. P. C.; CASTILHOS, Z. C. Avaliação de Risco Ecológico em Ecossistemas Aquáticos Contaminados por Mercúrio. Estudo de caso: Ilha das Enxadas, Baía de Guanabara, RJ. JIC-CETEM, 2003.

RODRIGUES, A. P. C.; RAMOS, A. S.; MUNIZ, K. P. M. S.; CASTRO, A. M.; LIMA, C. A.; PEDROSO, L. R. M.; CASTILHOS, Z. C.; BIDONE, E. D.; VIANA, T. A. P.; DE ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F. ; NOVO, L. A.; FREIRE, M.; LINDE, A. R. Aplicação do teste de micronúcleo para avaliação de áreas contaminadas do estado do Rio de Janeiro. In: VII Congresso de Ecologia do Brasil, 2005, Caxambú. Anais do VII Congresso de Ecologia do Brasil, 2005.

ROESIJADI, G. Metallothionein and Its Role in Toxic Metal Regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113C, No. 2, p. 117-123, 1996.

RODRIGUEZ, A. F. Os caminhos das águas. **Agroanalysis**, v.18, p.22-6, 1998.

SANCHÉZ-CHARDI, A.; LÓPES-FUSTER, M. J.; NADAL, J. Bioaccumulation of lead, Mercury and cadmium in the greater White-toothed shrew, *Crocidura russula*, from Ebro Delta (NE Spain): Sex-and age-dependente varition. **Environmental Pollution**, v. 145, p.1-6, 2007.

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

SHARMA, S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; PANDEY, S.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, P. J.; MATHUR, P. K. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus*, using the comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.53, p.617-623, 2007.

SHUGART, L. R. Environmental genotoxicology. In: RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2ºed. Washington: Taylor & Francis, 1995.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A.C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of neotropical freshwater fish

Prochilodus lineatus Valenciennes. **Bulletin of Environment Contamination and Toxicology**, v. 76, p. 505-511. 2006.

SIMONATO J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.69, p.112-120, 2008.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p. 184-191-336, 1988.

SKREB, Y.; HABAZAIN-NOVAK, V. Reversible inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in human cells by lead chloride. **Toxicology**, v.5, p.167-174, 1975.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single cell gel test) - a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair, in: D.S. Henderson (Ed.), **Methods in Molecular Biology** 113, DNA-repair Protocols: Eukaryotic Systems, Human Press Inc., Totowa, NY, 1999, p. 203–212.

SPERLING, E. V. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. *Bio*, v.2 (3), p.53-6, 1993.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, p.321-336, 1995.

SUIÇMEZ, M.; KAYIM, M.; KÖSEOĞLU, D.; HASDEMİR, E. Toxic Effects of Lead on the Liver and Gills of *Oncorhynchus mykiss* WALBAUM 1792. **Bulletin of Environment Contamination and Toxicology**, v.77, p.551-558, 2006.

SUZUKI, T.; HAYASHI, M.; HAKURA, A.; ASITA, A. O.; KODAMA, Y.; HONMA, M.; SOFUNI, T. Combination affects of clastogens in the mouse peripheral blood micronucleus assay. **Mutagenesis**, v.10(1), p.31-36, 1995.

TAJMIR-RIABI, H. A.; NAOUI, M. A.; AHMAD, R., The effects of Cu and Pb on the solution structure of calf thymus DNA. DNA condensation and denaturation studies by Fourier Transform IR difference spectroscopy. **Biopolymers**, v. 33, p. 1819-1827, 1993.

TANNER, D. C.; LIPSKY, M. M. (1984) Effects of lead acetate on N-(49-fluoro-4-biphenyl) acetamid-induced renal carcinogenesis. In: DUYDU, Y.; SUZEN, H. S.; AYDIN, A.; CANDER, O.; UYSAL, H.; ISIMER, A.; VURAL, N. **Environmental Contamination Toxicology**, v. 41, p. 241-246, 2001.

TICE, R. The Single Cell/ Cometa Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: PHILIPS, D.H.; VENNIT, S. (Eds.). **Environmental Mutagenesis**. Bio Scienific Publishers Ltd. Oxford, UK; p. 315-339, 1995.

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

TUCKER, D. J.; JULIAN-PRESTON, R. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.

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

UMBUZEIRO, G. A.; VALENT, G. U. Breve relato histórico da importância e utilização de testes de genotoxicidade no Brasil. In: V Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, 1998, Itajaí, SC. **Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil**, p. 3-13, 1998

VALVERDE, M.; FOURTOL, T. I.; DIAZ-BARRIGA, F.; MEJÍA, J.; CASTILLO, E. R. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. **Mutation**, v. 17(1), p. 55-61, 2002.

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v.631, p. 36–43, 2007.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish biocaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecolotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, p. 217-225, 1996.

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

VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H. C.; SILVEIRA, J. D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, cap. 7, p.147-163. 2003.

WANG, M.-Z.; JIA, X.-Y. Low levels of lead exposure induce oxidative damage and DNA damage in the testes of the frog *Rana nigromaculata*. **Ecotoxicology** DOI 10.1007/s10646-008-0262-5

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTAMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best science for human evaluation Part III: The Comet Assay na alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, v. 97(1), p. 21-26, 2007.

WOZNIAK, K.; JANUSZ B. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. **Mutation Research**. v.535, p.127 - 139, 2003.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. O. Metais Pesados em Águas Superficiais como Estratégia de Caracterização de Bacias Hidrográficas. **Química Nova**, v. 21, p. 551-556, 1998.

YÁÑEZ, L.; GARCÍA-NIETO, E.; ROJAS, E.; ARRIZALES, L.; MEJÍA, J.; CALDERÓN, J.; RAZO, I.; DIAZ-BARRIGA, F. DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining areas. **Environmental Research**. v. 93, p. 231–240, 2003.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 3rd ed. McElroy, W. D.; Swanson, C. P (eds.). New Jersey, USA, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, p.662, 1996.

ZHANG, Y.; HUANG, D.; ZHAO, D.; LONG, J.; SONG, G. LI, A. Long-term toxicity effects of cadmium and lead on *Bufo raddei* Tadpoles. **Bulletin of Environment Contamination and Toxicology**, v. 79, p.178-183, 2007.

ZHANG, Y.; WANG, 1Y.; YU, R.; ZHANG, S.; WU, Z. Effects of heavy metals Cd²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on DNA damage of loach *Misgurnus anguillicaudatus*. **Frontiers of Biology in China**, v. 3(1), p. 50-54, 2008.