



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATÁLIA CESTARI MORENO

**“EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO HERBICIDA
GLIFOSATO E DO PRODUTO FORMULADO ROUNDUP
TRANSORB® PARA UM PEIXE NEOTROPICAL:
TESTES *IN VIVO* E *IN VITRO*”**

Londrina
2011

NATÁLIA CESTARI MORENO

**“EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO HERBICIDA
GLIFOSATO E DO PRODUTO FORMULADO ROUNDUP
TRANSORB® PARA UM PEIXE NEOTROPICAL:
TESTES *IN VIVO* E *IN VITRO*”**

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: Dra. Silvia Helena Sofia

Co-orientadora: Dra. Cláudia B. R. Martinez

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M843e Moreno, Natália Cestari.
Efeitos genotóxicos e citotóxicos do herbicida glifosato e do produto formulado Roundup Transorb® para um peixe neotropical : testes *in vivo* e *in vitro* / Natália Cestari Moreno – Londrina, 2011.
127 f. : il..

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Co-orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Prochilodus lineatus – Teses. 2. Peixe – Células – Efeito citotóxico – Teses. 3. Peixe – Toxicidade genética – Teses. 4. Peixe – Efeito dos herbicidas – Teses. 5. Toxicidade – Testes. I. Sofia, Silvia Helena. II. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 597.554.1

NATÁLIA CESTARI MORENO

**“EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO HERBICIDA
GLIFOSATO E DO PRODUTO FORMULADO ROUNDUP
TRANSORB® PARA UM PEIXE NEOTROPICAL: TESTES *IN VIVO* E
IN VITRO”**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudia B. R. Martinez
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Cesar Koppe Grisólia
UnB – Brasília – DF

Prof. Dra. Berenice Q. Jordão
UEL – Londrina – PR

Londrina, 28 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, meu pai, irmã e
às minhas orientadoras Claudia e Silvia.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar”. Chico Xavier

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que fez tua rosa tão importante”. Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

À minha **mãe** e ao meu **pai** que me ajudaram a tornar esse sonho realidade, por terem abdicado muitos de seus sonhos em favor dos meus, por me darem força em todos os momentos da minha vida, por lutarem comigo, por me ajudarem a conquistar meus objetivos e por serem mais que meus pais. Vocês são meus eternos amigos e companheiros. Amo muito vocês.

À minha **irmã** que junto com meus pais sempre esteve me apoiando, me dando forças para agüentar as dificuldades e festejando comigo minhas conquistas. Você é a melhor irmã do mundo. Você é o meu presente de Deus.

Aos meus **avós** que sempre torceram muito por mim. Amo muito.

Ao **Rê** por me apoiar, por entender minha ausência em muitos momentos, por não me deixar desanimar, por me entender, me aceitar e me amar.

À **Professora Silvia** que foi a primeira que me abriu as portas, que me acolheu e me deu oportunidade de fazer o mestrado. Agradeço à Deus por ter colocado uma pessoa com um coração tão grande e generoso no meu caminho, pois isso fez minha trajetória na UEL ser mais fácil. Sentirei muito a sua falta.

À **Professora Claudia** pela compreensão, atenção, dedicação, carinho e principalmente pela paciência. Obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, por ter confiado seu trabalho em minhas mãos, por ter contribuído no meu amadurecimento científico, pelos momentos de ensinamentos e pelos de descontração. Não existem palavras para falar o que você e a Silvia significam para mim. Vocês foram muitas vezes mais amigas do que orientadoras. Vocês definitivamente são um exemplo a seguir, tanto como pessoa, quanto

profissional. Só quero que saibam que vocês são muito importantes e farão muita falta na minha vida.

À Professora **Marta** pelos helps, pela atenção, pelos conselhos, pelas ajudas científicas e pelos bolos maravilhosos, rss. Você fez muita falta no LEFA.

Ao pessoal **LEFA**, pela amizade, ajuda, companheirismo, pelas festas e por fazer meus dias em Londrina muito melhores. Sem vocês seria impossível a realização do meu trabalho. Adoro todos vocês: Dálit, Cy, Thaizoca, Lú, Cássia, Déia, Alê, Jú, Fran, Kelly, Lindi, Rafa, Thi, Bruna, Claudinha e também os que já não estão mais no lab: Rafa, Vanessa, Kathya e Nelissa.

Ao pessoal do **LAGEA**, que também foram grandes amigos para todas as horas: Gabi (minha grande amiga e dupla na inesquecível prova da Leda), Alê, Douglas, Karen, Professora Leda e Professora Fer.

À **Alessandra** (Alê), que foi uma grande amiga, que agüentou meus momentos de estresse, meus choros, que me apoiou nos momentos de dificuldades, cuidou de mim quando precisei e também participou comigo de muuuuitoos momentos alegres. Alê sua amizade estará guardada comigo pro resto da vida.

Ao **Rafa**, meu grande amigo, que me incentivou e me deu um grande apoio durante essa etapa da minha vida. Só tenho a agradecer a pessoa maravilhosa que você é.

À **Cylene, Dalita, Maressa, Angélica, Luciana** e a **Cássia** que são amigas que eu nunca vou esquecer. Vocês estiveram comigo em todos os momentos tanto os felizes quanto os tristes e fizeram com que minha passagem pela UEL e por Londrina ficasse bem mais fácil e alegre. Adoro vocês do fundo do meu coração.

Ao **Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular** e a **Universidade Estadual de Londrina** pela oportunidade, pelo apoio, pela atenção e pelo respeito. Só tenho a agradecer tudo o que vocês fazem por nós alunos. Foi muito bom fazer parte deste programa.

À **Professora Ana Lúcia** pela paciência, pelo carinho e pela atenção. Te admiro muito como pessoa e profissional. Vou sentir saudades.

À **Sueli**, secretária do PPG, pela atenção, educação, gentileza, paciência e cuidado com todos os alunos do programa.

À **CAPES** pelo apoio financeiro e que muito colaborou com o desenvolvimento deste trabalho.

À **Banca Examinadora** por ter aceitado o convite e por colaborar com este trabalho.

Agradeço também o apoio, amizade e o companheirismo das minhas amigas da vida inteira: **Fer, Déh, Fer Palazim e a Carol**. Vocês são bem mais que amigas. Vocês são as irmãs que Deus me permitiu escolher. Amo muito vocês!!!

À **Deus** que é a nossa força maior.

E a todos digo que foi impossível escrever estes agradecimentos sem me emocionar. Vocês são muito especiais!!!

MORENO, Natália Cestari. **Efeitos genotóxicos e citotóxicos do herbicida glifosato e do produto formulado Roundup Transorb® para um peixe neotropical: testes *in vivo* e *in vitro*.** 2011.127 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido para investigar se o glifosato e seu produto formulado o herbicida Roundup Transorb® (RT) causam danos à molécula de DNA do peixe *Prochilodus lineatus* por meio de testes *in vivo* e *in vitro*. Nos ensaios *in vivo* foram utilizados o ensaio do cometa (em eritrócitos e células branquiais), o teste do micronúcleo e outras alterações eritrocíticas nucleares (AEN). Nos ensaios *in vitro* realizados com eritrócitos, além do ensaio do cometa, foram utilizados o ensaio de difusão do DNA para avaliar a ocorrência de apoptose e necrose, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), avaliação da capacidade antioxidante (CAO) e o tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN). Nos testes *in vivo* foram utilizados juvenis de *P. lineatus* expostos a duas concentrações (1 e 5 mg.L⁻¹) de glifosato e RT ou apenas à água desclorada (controle negativo ou CN), durante 6, 24 e 96 h. Para os testes *in vitro* foram utilizados eritrócitos da mesma espécie de peixe expostos às mesmas concentrações dos dois agroquímicos, nos tempos de 1, 3 e 6 h. Como controle negativo (CN) foram utilizadas células expostas apenas à solução salina. Os resultados do ensaio do cometa obtidos nos testes *in vivo* mostraram que os eritrócitos dos peixes expostos ao glifosato, por 6 e 96 h, e ao RT, por 24 e 96 h, nas duas concentrações, apresentaram escore de danos no DNA significativamente maior que os respectivos CN. Para as células branquiais o glifosato foi genotóxico apenas após 6 h, na maior concentração, e o RT apenas em 24, nas duas concentrações testadas. No teste do micronúcleo tanto o glifosato quanto o RT não induziram a ocorrência de MN nos eritrócitos, tão pouco a ocorrência de outras AEN foi significativamente maior que no CN. Assim, tanto o glifosato quanto o RT causaram danos à molécula de DNA de *P. lineatus*, mas de forma mais acentuada nos eritrócitos do que nas células branquiais. Por outro lado, o princípio ativo e o produto formulado não exerceram efeito mutagênico no DNA dos eritrócitos. Os resultados do ensaio do cometa dos testes *in vitro* revelaram aumento significativo no escore de danos, em relação ao CN, após 1 h de exposição na menor concentração de glifosato, e nos três tempos de exposição às duas concentrações de RT. O ensaio que detecta a produção de ERO mostrou aumento de ERO e da CAO, em relação ao CN, após 1 h de exposição à 1mg.L⁻¹ de glifosato e aumento de ERO e diminuição da CAO, também em comparação ao CN, após 1 h de exposição à 5mg.L⁻¹ de RT. As análises do ensaio de difusão do DNA não revelaram aumento da ocorrência de células apoptóticas e/ou necróticas nos grupos expostos do glifosato e ao RT. E o TRVN mostrou diminuição da estabilidade dos lisossomos expostos a 5 mg.L⁻¹ de glifosato após 3 e 6 h e às duas concentrações de RT a partir de 1 h. Os resultados do ensaio do cometa mostraram que o RT tem um efeito maior sobre os eritrócitos de *P. lineatus*, quando comparado com seu princípio ativo. Os danos no DNA não devem ter apenas origem oxidativa, porque os resultados obtidos

pelo TRVN sugerem que eles podem ter relação com as enzimas liberadas no interior da célula devido à desestabilização dos lisossomos. Entretanto, esses danos não foram suficientes para induzir morte por apoptose/necrose, sugerindo a atuação do sistema de reparo. O uso integrado de testes *in vivo* e *in vitro*, juntamente com as técnicas empregadas neste trabalho, demonstrou ser uma valiosa ferramenta para a compreensão dos mecanismos de toxicidade do glifosato e do RT sobre a molécula de DNA do *P. lineatus*.

Palavras-chave: Brânquia. Ensaio do cometa. Eritrócitos. Espécies reativas de oxigênio. *Prochilodus lineatus*. Tempo de retenção do vermelho neutro. Teste do micronúcleo.

MORENO, Natália Cestari. **Cytotoxic and genotoxic effects of glyphosate and the glyphosate-based herbicide Roundup Transorb® on a Neotropical fish: *in vivo* and *in vitro* tests.** 2011. 127 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

This study was designed to investigate whether glyphosate and its commercial formulation Roundup® Transorb (RT) can damage the DNA molecule of the fish *Prochilodus lineatus* by using *in vivo* and *in vitro* tests. In the *in vivo* assays, the comet assay (in gill cells and erythrocytes), the micronucleus test and the analysis of other erythrocyte nuclear abnormalities (ENA) were applied. The *in vitro* tests were carried out with fish erythrocytes, and in addition to the comet assay, it was performed the DNA diffusion assay, to evaluate the occurrence of apoptosis and necrosis, and assays to determine the production of reactive oxygen species (ROS), the total antioxidant capacity (AC) and the neutral red retention time (NRRT). *In vivo* tests were performed with juveniles of *P. lineatus* exposed to two concentrations (1 and 5 mg.L⁻¹) of glyphosate and RT or only to dechlorinated water (negative control or CN) for 6, 24 and 96 h. *In vitro* tests were developed using the erythrocytes exposed to the same concentrations of both herbicides, during 1, 3 and 6 h. For the negative control (NC) cells were exposed only to saline. The results of the comet assay obtained in the *in vivo* tests showed that the erythrocytes of fish exposed to both concentrations of glyphosate, for 6 and 96 h, and of RT, for 24 and 96 h, showed a score of DNA damage significantly higher than their respective NC. For the gill cells a significant increase in the score of DNA damage was observed only after 6 h exposure to the highest glyphosate concentration and after 24 h exposure to both RT concentrations. The results of the micronucleus test showed that both glyphosate and RT concentrations did not induce MN and the occurrence of other ENA was not significantly higher than NC. Thus, both RT and glyphosate caused damage to the DNA of *P. lineatus*, which was more evident in erythrocytes than in gill cells. Moreover, the active ingredient and the formulated product did not produce mutagenic effect on the DNA of both cell types. The results of the comet assay of the *in vitro* tests revealed a significant increase in the score of DNA damage, when compared to the NC, after 1 h of exposure to the lower glyphosate concentration, and at the 3 exposure periods to both concentrations of RT. The test which detects ROS production showed a significant increase in ROS generation and in AC, in relation to NC, 1 h after exposure to 1mg.L⁻¹ of glyphosate, and increased ROS and reduced AC, also in comparison to NC, after 1 h of exposure to 5 mg.L⁻¹ of RT. The analysis of the DNA diffusion assay did not reveal any increase in the occurrence of apoptotic and necrotic cells in the groups exposed to glyphosate or RT. The NRRT showed a decrease in the stability of lysosomes of the cells exposed to 5 mg.L⁻¹ of glyphosate, after 3 and 6 h, and to both concentrations of RT, after 1, 3 and 6 h. The results of the comet assay showed that RT has a greater effect on the erythrocytes of *P. lineatus*, when compared with its active ingredient. The DNA damage observed was not only from oxidative origin, because the results obtained by the NRRT suggest that they may be related to the enzymes released into the cell due to the destabilization of lysosomes. However, these damages were not

sufficient to induce apoptosis/necrosis, suggesting an efficient repair system. The integrated use of *in vivo* and *in vitro*, together with the techniques employed in this work, has proved to be a valuable tool for understanding the mechanisms of toxicity of glyphosate and RT on the DNA molecule of *P. lineatus*.

Keywords: Comet assay. Erythrocytes. Gill. Micronucleus test. *Prochilodus lineatus*. Reactive oxygen species. Neutral red retention time.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Meios de contaminação por Agroquímicos. Adaptado de Nimmo, 1985	23
Figura 2 – Fórmula estrutural do Glifosato (WILLIANS <i>et al.</i> , 2000)	26
Figura 3 – Juvenil de <i>Prochilodus lineatus</i>	30
Figura 4 – Representação esquemática da ordem seqüencial ao estresse de poluentes dentro de um sistema biológico. Adaptado de VAN DER OOST, 2003	32
Figura 5 – Classes de danos verificados pelo Ensaio do Cometa no presente trabalho, classificados de acordo com Singh <i>et al.</i> (1988): 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) e 3 (muito dano)	37
Figura 6 – Esquema mostrando a formação de um MN, através de um evento clastogênico (Ribeiro, 2003)	39
Figura 7 – Esquema mostrando a formação de um MN, através de um evento aneugênico (Ribeiro, 2003)	39
Figura 8 – Eritrócito normal, micronúcleo (foto do MN cedida pelo Laboratório de Ecofisiologia Animal), núcleo em forma de rim, segmentado e lobulado observados no presente trabalho e classificados de acordo com Carrasco (1999).....	41
Figura 9 – Nucleóide normal, apoptótico e necrótico, observados no presente trabalho classificados segundo Singh (2000)	43
Figura 10 – O papel do ferro no dano oxidativo do DNA. Radicais superóxido formados a partir de fontes celulares (tais como mitocôndria e retículo endoplasmático) sofrem dismutação para H ₂ O ₂ e também causam liberação de Fe(II) a partir de proteínas que contém Fe-S. Quando o Fe (II) se liga ao DNA reage com o H ₂ O ₂ e produz reação de Fenton sítio-específica e formação de •OH, levando ao dano oxidativo no DNA. Adaptado de Hermes-Lima, 2004.....	46

ARTIGO A

- Figura 1** – Escores de dano em células branquiais de *P. lineatus*, expostos apenas à água (CN) ou ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05) 62
- Figura 2** – Escores de dano em células branquiais de *P. lineatus*, expostos apenas à água (CN) ou ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05)..... 64
- Figura 3** – Escores de dano nos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à água (CN) ou ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (p < 0,01) 66
- Figura 4** – Escores de dano dos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à água (CN) ou ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05)..... 68
- Figura 5** – Frequência média de ocorrência de AEN (núcleo lobulado (NL), núcleo segmentado (NS) e núcleo em forma de rim (NR)), para

cada 1000 eritrócitos analisados, nos peixes dos grupos CN, 1 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ e CP, após 6, 24 e 96 h de exposição ao glifosato. N = número de animais analisados. Os resultados representam o valor da média ± erro padrão (P < 0,05) 71

Figura 6 – Freqüência média de ocorrência de AEN (núcleo lobulado (NL), núcleo segmentado (NS) e núcleo em forma de rim (NR)), para cada 1000 eritrócitos analisados, nos peixes dos grupos CN, 1 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ e CP, após 6, 24 e 96 h de exposição ao RT. N = número de animais analisados. Os resultados representam o valor da média ± erro padrão (P < 0,05) 72

ARTIGO B

Figura 1 – Escores de dano nos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à PBS (CN), ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,01) 94

Figura 2 – Escores de dano nos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à PBS (CN), ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,01) 96

Figura 3 – Produção de ERO dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN) e ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05) 98

Figura 4 – Capacidade antioxidante total dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN) e ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras

	representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).....	98
Figura 5 –	Produção de ERO dos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à PBS (CN) e ao RT (1 mg.L ⁻¹ e 5 mg.L ⁻¹), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05)	99
Figura 6 –	Capacidade antioxidante total dos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à PBS (CN) e ao RT (1 mg.L ⁻¹ e 5 mg.L ⁻¹), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).....	99
Figura 7 –	Tempo de Retenção do corante vermelho neutro em lisossomos presentes nos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> , expostos apenas à PBS (CN) ou ao glifosato (1 mg.L ⁻¹ e 5 mg.L ⁻¹) após 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).....	102
Figura 8 –	Tempo de Retenção do corante vermelho neutro em lisossomos presentes nos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> , expostos apenas à PBS (CN) ou ao RT (1 mg.L ⁻¹ e 5 mg.L ⁻¹) após 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05)	103

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1** – Freqüência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados (média ± EP) em células branquiais de *P. lineatus* expostos apenas à água (CN) ou ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. 63
- Tabela 2** – Freqüência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados (média ± EP) em células branquiais de *P. lineatus* expostos apenas à água (CN) ou ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. 65
- Tabela 3** – Freqüência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados nos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CN) ou ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. 67
- Tabela 4** – Freqüência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados nos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CN) ou ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. 68
- Tabela 5** – Freqüência média de ocorrência, para cada 1000 eritrócitos analisados, de micronúcleos nos peixes dos grupos CN ou expostos a 1 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ de glifosato após 6, 24 e 96 h. O

	controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h.	70
Tabela 6 –	Freqüência média de ocorrência, para cada 1000 eritrócitos analisados, de micronúcleos nos peixes dos grupos CN ou expostos a 1 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ de RT após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h.	71
 ARTIGO B		
Tabela 1 –	Freqüência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados nos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à PBS (CN), ao glifosato (1 mg.L ⁻¹ e 5 mg.L ⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h.	95
Tabela 2 –	Freqüência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados nos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à PBS (CN), ao RT (1 mg.L ⁻¹ e 5 mg.L ⁻¹) e o MMS (CP) após 1, 3 e 6 h.	96
Tabela 3 –	Freqüência de células apoptóticas e necróticas dos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à PBS (CN), ao glifosato (1 mg.L ⁻¹ e 5 mg.L ⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h.	100
Tabela 4 –	Freqüência de células apoptóticas e necróticas dos eritrócitos de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à PBS (CN), ao RT (1 mg.L ⁻¹ e 5 mg.L ⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h.	101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA	20
1.2 POLUIÇÃO AQUÁTICA POR AGROQUÍMICOS	22
1.3 GLIFOSATO	25
1.4 ROUNDUP TRANSORB®	27
1.5 BIOINDICADOR	29
1.6 PROCHILODUS LINEATUS	30
1.7 BIOMARCADORES	31
1.7.1 Ensaio do Cometa	34
1.7.2 Teste do Micronúcleo e Alterações Eritrocíticas Nucleares	38
1.7.3 Ensaio de Difusão do DNA ou Teste do Halo	41
1.7.4 Espécies Reativas de Oxigênio	43
1.7.5 Tempo de Retenção do Vermelho Neutro	47
2 OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVOS GERAIS	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3 ARTIGO A	52
RESUMO	53
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.1 ACLIMATAÇÃO	57
2.2 TESTES DE TOXICIDADE	57
2.3 VIABILIDADE CELULAR	59
2.4 ENSAIO DO COMETA	59
2.5 TESTE DO MICRONÚCLEO	60
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	61
3 RESULTADOS	61
3.1 DANOS NO DNA AVALIADOS PELO ENSAIO DO COMETA	61
3.2 OCORRÊNCIA DE MICRONÚCLEO E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES	69
4 DISCUSSÃO	72

AGRADECIMENTOS	77
REFERÊNCIAS	78
5 ARTIGO B	83
RESUMO	84
1 INTRODUÇÃO	84
2 MATERIAIS E MÉTODOS	88
2.1 ACLIMATAÇÃO	88
2.2 ENSAIOS “ <i>IN VITRO</i> ”	88
2.3 VIABILIDADE CELULAR	89
2.4 ENSAIO DO COMETA	89
2.5 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA	91
2.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	91
2.7 TEMPO DE RETENÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (TRVN).....	93
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	93
3 RESULTADOS	94
3.1 ENSAIO DO COMETA	94
3.2 ESPÉCIE REATIVA DE OXIGÊNIO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	97
3.3 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA	99
3.4 TEMPO DE RETENÇÃO DO VERMELHO NEUTRO	101
4 DISCUSSÃO	103
AGRADECIMENTOS	107
REFERÊNCIAS	108
CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA

Os ambientes aquáticos cobrem dois terços do planeta e são habitados pela maioria das espécies existentes nos diferentes nichos ecológicos (JHA, 2004). Do volume total de água doce, 75% estão distribuídos nos pólos, na forma de gelos e geleiras, 23% estão distribuídos em águas subterrâneas e apenas 2% estão disponíveis em rios e lagos (LLOYD, 1992).

A água é um solvente versátil, freqüentemente usado para transportar produtos residuais para longe do local de produção e descarga. Infelizmente, os produtos residuais transportados são tóxicos na maioria das vezes, e sua presença pode degradar seriamente o ambiente do rio, lago ou riacho receptor (WHITE, 1998). Nos últimos anos, os xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vêm aumentando de forma alarmante como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Tal fato tem contribuído para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Os xenobióticos são substâncias tóxicas ou estranhas que podem ser introduzidas deliberadamente ou acidentalmente no ecossistema aquático, prejudicando a qualidade da água e tornando-a imprópria para a vida aquática (RAND, 1995).

Praticamente toda atividade humana constitui uma fonte potencial de contaminantes para os ecossistemas aquáticos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006), sendo que a grande proporção desses contaminantes é composta de substâncias potencialmente genotóxicas e carcinogênicas (JHA, 2004). Entre os ecossistemas aquáticos que vêm tendo sua qualidade afetada pela atividade humana e pela degradação ambiental podemos destacar os ecossistemas aquáticos tropicais.

A partir do século 20, milhares de poluentes orgânicos, como as bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas organoclorados (POPs), hidrocarbonetos

aromáticos policíclicos (HPAs), dibenzofuranos policlorados (PCDF) e dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD) têm sido produzidos e, em parte, liberados no meio ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003), principalmente nos ambientes aquáticos tanto marinhos quanto de água doce.

A partir do início dos anos 60, a humanidade começou a tomar consciência dos efeitos adversos que os produtos químicos em geral podem causar a longo prazo, e dos seus riscos potenciais para os ecossistemas aquáticos e terrestres (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A crescente preocupação com os efeitos negativos que os produtos químicos podem causar às diferentes espécies levou ao surgimento da ecotoxicologia. Esse ramo da toxicologia tem como objetivo estudar os efeitos tóxicos de substâncias naturais ou artificiais em organismos vivos, podendo ser eles, animais ou vegetais, que vivem em ambientes terrestres ou aquáticos e que fazem parte da biosfera, além de incluir a interação destas substâncias com o ambiente físico em que esses organismos vivem (RAND, 1995).

De um modo geral, os poluentes podem exercer seus efeitos de várias maneiras, dependendo de suas características, do corpo d'água receptor e da comunidade biológica presente no local. Em alguns casos, os agentes tóxicos podem matar os animais, mas em concentrações menores podem exercer efeitos subletais, podendo se acumular nos tecidos dos organismos e exercer seus efeitos após exposição prolongada a concentrações tão baixas que dificilmente são determinadas quimicamente (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

A avaliação destes efeitos pode ser realizada por meio de testes de toxicidade (FERREIRA, 2002), que podem ser realizados com organismos de águas continentais, estuarinas, marinhas, em condições laboratoriais ou de campo (BERTOLETTI, 1990). Estes testes estão sendo cada vez mais utilizados para a determinação dos efeitos deletérios de poluentes em organismos aquáticos, em virtude do risco potencial da transferência de poluentes do ambiente para os organismos, e também para a avaliação da qualidade da água (FERREIRA, 2002). Ainda, possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas e avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores (BERTOLETTI, 1990).

Entre os testes de toxicidade, tem se utilizado os de toxicidade aguda, que simulam a situação ambiental na qual o organismo é exposto ao agente tóxico durante um curto período de tempo (para peixes, geralmente de 24 a 96 horas) (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). De maneira geral, os testes de toxicidade devem ser considerados uma análise indispensável no controle da poluição hídrica, pois se fundamentam na utilização de organismos vivos que são diretamente afetados pelos eventuais desequilíbrios nos ecossistemas aquáticos onde vivem (BERTOLETTI, 1990). Porém, ainda existem poucas pesquisas que avaliam e monitoram o impacto de contaminantes nos ecossistemas tropicais e em sua biota aquática (LACHER; GOLDSTEIN, 1997; BOZZETTI; SCHULZ, 2004). Nos mais variados ecossistemas aquáticos do Brasil, as espécies nativas sofrem freqüentes ameaças devido à sua exposição direta aos agentes carregados pela água ou, indiretamente, por alimentos contaminados (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2000).

1.2 POLUIÇÃO AQUÁTICA POR AGROQUÍMICOS

Em todo mundo, o uso de agroquímicos aumentou dramaticamente durante as últimas duas décadas, coincidindo com as mudanças nas práticas agrícolas e a agricultura cada vez mais intensiva. O uso generalizado de agroquímicos, tanto para fins agrícolas como não agrícolas, resultou na presença de seus resíduos em várias matrizes ambientais. Esse uso indiscriminado constitui um grande problema que dá origem a preocupações em escalas locais, regionais, nacionais e globais (KONSTANTINO *et al.*, 2006). Esta preocupação se deve ao fato de os pesticidas serem geralmente aplicados em grande quantidade, em áreas bastante extensas e possuir grande persistência no meio ambiente, além de gerar sérios problemas de qualidade das águas superficiais e subterrâneas (BAIRD, 2002; PRIMEL *et al.*, 2005).

A utilização de pesticidas na agricultura pode levar à contaminação de águas superficiais e subterrâneas através de vários meios,

como escoamento superficial, drenagem, lixiviação e infiltração (Figura 1) (NIMMO, 1985). Outras formas de contaminação também podem ocorrer, como através da volatilização dos compostos aplicados nos cultivos, pela formação de poeira do solo contaminado e/ou da pulverização de agroquímicos, que podem ser transportados por correntes aéreas e se depositarem no solo e na água (FILIZOLA *et al.*, 2002; COOPER, 1993). A contaminação da água superficial pode ter efeitos ecotoxicológicos para a flora e fauna aquáticas, bem como para a saúde humana quando é usada para consumo (CEREJEIRA *et al.*, 2001).

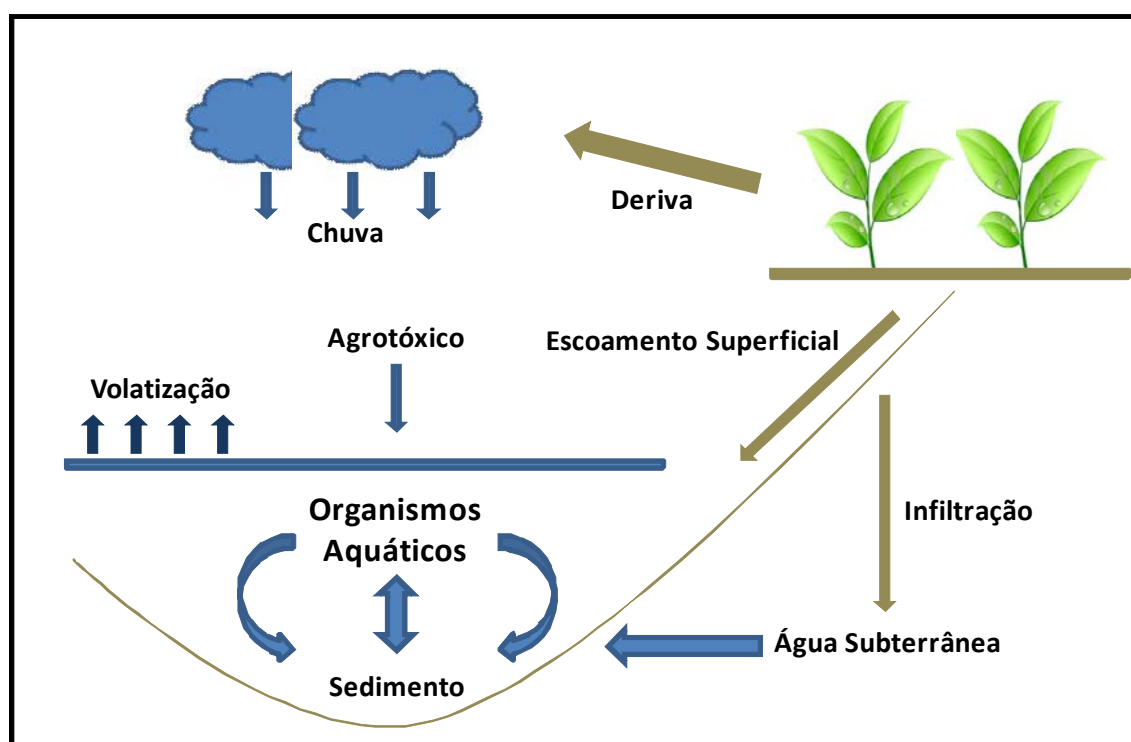


Figura 1 – Meios de contaminação por Agroquímicos. Adaptado de Nimmo, 1985.

Os agroquímicos atingem as águas superficiais a partir de campos agrícolas basicamente por escoamento superficial. A quantidade de agroquímicos transportados para as águas superficiais depende de vários fatores, incluindo características do solo, topografia, clima, práticas agrícolas, propriedades químicas e ambientais de cada agroquímicos. Os efeitos combinados desses

fatores são em grande parte desconhecidas (LARSON *et al.*, 1995; KONSTANTINOOU *et al.*, 2006).

Segundo um levantamento encomendado pela Andef (Associação Nacional de Defesa Vegetal), o Brasil é o maior mercado de agrotóxicos do mundo, e movimentou em 2008 cerca de 7,1 bilhões de dólares (JORNAL - O ESTADO DE SÃO PAULO). O consumo destes produtos varia de acordo com a região geográfica do Brasil, em função do tipo de atividade agrícola que é mais expressiva no local (JACOMINI *et al.*, 2006). As culturas responsáveis por este elevado consumo são principalmente soja, cana-de-açúcar, milho e arroz.

Deve-se levar em consideração que os agroquímicos presentes no ambiente aquático podem afetar os organismos que nele vivem de diferentes maneiras. A taxa de acumulação desses produtos nos organismos depende do tipo de alimentação, da disponibilidade e persistência do contaminante na água. Peixes e invertebrados aquáticos podem acumular agroquímicos em concentrações muito maiores do que aquelas encontradas na água, pois tais compostos químicos podem se bioacumular ou se adsorver ao material particulado em suspensão, que pode ser ingerido pelos organismos presentes neste ambiente (NIMMO, 1985; VENTURA *et al.*, 2008). Deste modo, o biomonitoramento das possíveis conseqüências da exposição aos agroquímicos é uma linha de pesquisa muito importante (CASTRO, 2004), pois eles são muitas vezes tóxicos, podendo ser cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e/ou mimetizadores de hormônios (BAIRD, 2002).

O comportamento dos agroquímicos no ambiente pode ser diferente em condições temperadas ou tropicais. Alguns resultados sugerem que as taxas de degradação podem ser superiores em países tropicais, devido à maior temperatura e incidência de sol (DAAM; VAN DER BRINK, 2010). Outros trabalhos já mostraram que a toxicidade pode aumentar com o aumento da temperatura (HOWE *et al.*, 1994). Porém existem poucos estudos sobre os efeitos tóxicos de agroquímicos para organismos aquáticos, desenvolvidos nos trópicos com espécies tropicais, tanto para a questão de registro de produtos como para análise de impacto ambiental no ambiente aquático (DAAM; VAN DER BRINK, 2010).

1.3 GLIFOSATO

O glifosato foi originalmente sintetizado em 1950 e utilizado primeiramente na indústria devido ao seu potencial quelante. Somente em 1971 foi descoberta a propriedade de herbicida da molécula de glifosato (WILLIANS *et al.*, 2000; YAMADA; CASTRO, 2007), que desde então vem sendo muito utilizada para o controle de plantas invasoras, tanto na agricultura quanto para o uso doméstico (EPA, 1993; SOLOMON; THOMPSON, 2003).

É o herbicida de maior participação no mercado mundial, devido à sua eficiência no controle das plantas invasoras; é muito eficaz para o controle de plantas invasoras perenes, e mais eficaz do que muitos outros herbicidas seletivos que afetam somente as partes aéreas da planta (SOLOMON; THOMPSON, 2003).

Existem mais de 90 marcas comerciais de glifosato no mundo (HEAP, 1997). No Brasil, esse herbicida é formulado com diferentes sais, tais como o sal potássio, sal de isopropilamina e sal de amônio. Dado que os herbicidas à base de glifosato são os mais amplamente utilizados no mundo, seus resíduos são poluentes encontrados com frequência no ambiente (INOUE *et al.*, 2003).

O herbicida glifosato [N-(fosfometil)glicina] (Figura 2) é pós-emergente e não seletivo amplamente utilizado na agricultura (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005). Possui a fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (FRANZ *et al.*, 1997), apresentando três grupos funcionais: amina, carboxil e fosfato. Em condições ambientais o glifosato é muito solúvel em água e quase insolúvel em solventes orgânicos comuns (WILLIANS *et al.*, 2000), tais como acetona, etanol, entre outros.

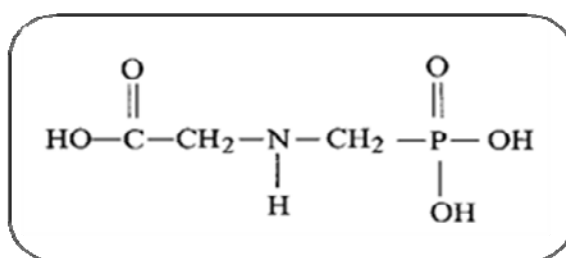


Figura 2 – Fórmula estrutural do Glifosato (WILLIANS *et al.*, 2000)

Considerando sua elevada solubilidade, seria esperado que o glifosato tivesse bastante mobilidade na água, porém ele é facilmente ionizado, sendo fortemente adsorvido em sedimentos e solos de pH > 3,5. Assim, não tem quase nenhuma mobilidade nos solos e é rapidamente removido da água para os sedimentos e partículas em suspensão (SOLOMON; THOMPSON, 2003). A velocidade de degradação deste herbicida em diferentes solos e na água varia de acordo com o grau de atividade microbiana do solo e a presença de certos íons metálicos (BARJA *et al.*, 2001). A degradação do glifosato por microorganismos do solo e da água o transforma em ácido aminometilfosfônico (AMPA). O AMPA é o único metabólito do glifosato encontrado em quantidades significativas em sistemas biológicos, sendo moderadamente (~20%) absorvido pelo trato digestivo e a excreção ocorrendo quase totalmente pela urina (SMITH; OEHME, 1992).

O glifosato age nas plantas alterando diversos processos bioquímicos vitais, tais como, a biossíntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Assim que o herbicida é absorvido pelo tecido vivo e translocado, via floema, para raízes e rizomas, inibe a ação da enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintase (EPSP). A EPSP localiza-se no cloroplasto e sua inibição interrompe a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano, os quais são precursores de outros produtos como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos. As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas, devido a inibição da produção das proteínas comentadas acima e devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive (AMARANTE JR *et al.*, 2002; COUTINHO; MAZO, 2005).

O uso deste herbicida na agricultura continua se expandindo, especialmente em aplicações que envolvem variedades de plantas geneticamente modificadas, resistentes ao glifosato, conhecidas como Roundup Ready (WILLIAMS *et al.*, 2000). As plantas Roundup Ready possuem o gene Roundup Ready, também conhecido como cp4-epsps, que confere a essas plantas tolerância ao glifosato. Este gene foi isolado de uma bactéria, a *Agrobacterium spp*, resistente ao glifosato, e introduzido nas plantas pelo processo de biobalística, no qual o segmento de DNA resistente da bactéria foi introduzido nas células vegetais. Como o glifosato não consegue bloquear a enzima EPSP, nestas plantas a via metabólica não é interrompida e as plantas se desenvolvem normalmente (PIONNER, 2010).

Dado que a via bioquímica sobre a qual o glifosato atua não é encontrada nos animais, sua toxicidade é baixa para estes organismos (AMARANTE JR *et al.*, 2002; GALLI; MONTEZUMA, 2005). Em ambientes aquáticos, a toxicidade do glifosato pode ser acentuada com o aumento da temperatura e do pH (AMARANTE JR *et al.*, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) a LD₅₀ oral do glifosato puro em ratos é de 4.230 mg.Kg⁻¹, enquanto que o fabricante (Monsanto) cita LD₅₀ de 5.600 mg.kg⁻¹ (AMARANTE JR *et al.*, 2002). Um estudo desenvolvido por Giesy (2000), com a espécie de peixe *Oncorhyncus mykiss*, conhecida popularmente como truta arco íris, mostrou que a CL₅₀ do glifosato está entre 140 a 240 mg.L⁻¹, dependendo do tempo de exposição.

1.4 ROUNDUP TRANSORB®

A formulação de glifosato mais amplamente usada para o controle de plantas invasoras terrestre é Roundup® e seus produtos formulados (SOLOMON; THOMPSON, 2003), dentre estes produtos podemos destacar o Roundup Transorb® (RT).

Assim como o glifosato, o RT é um herbicida de amplo espectro e não seletivo, podendo ser utilizado na agricultura, horticultura e áreas aquáticas para o controle de plantas invasoras em geral (BULA DO ROUNDUP TRANSORB®). Foi desenvolvido para ser aplicado em períodos de chuva, pois é absorvido pela planta em apenas uma hora após a aplicação, enquanto que a outra formulação, o Roundup, precisa de pelo menos, quatro horas para ser absorvido em quantidades suficientes. Nas atividades agrícolas, tem se utilizado cerca de 1,0 a 4,5 L/ha do RT, dependendo da espécie de planta invasora que se pretende combater (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

O RT vem sendo comercializado no Brasil desde 1998. Este produto é formulado com 68,4% do sal de isopropilamina, 48% equivalente ao ácido de N-(fosfometil) glicina (glifosato) e 59,4% de ingredientes inertes (BULA DO ROUNDUP TRANSORB®). O surfactante desta fórmula não é divulgado pelo fabricante; o que se sabe a respeito é que se trata de uma mistura de surfactantes contendo 15% de polietoxileno amina (POEA) e outras substâncias não divulgadas (HOWE *et al.*, 2004), recebendo esta mistura o nome de Transorb.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde a toxicidade do glifosato é baixa (WHO, 1994), entretanto, os produtos formulados a base de glifosato são geralmente mais tóxicos (AMARANTE JR *et al.*, 2002; PEIXOTO, 2005), principalmente devido à adição de surfactantes à fórmula (TSUI; CHU, 2003). Um estudo de toxicidade aguda com glifosato demonstrou que a CL₅₀ para o peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é de 86 mg.L⁻¹, em 96 horas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005), enquanto que em um outro estudo com o RT, utilizando o peixe paulistinha (*Danio rerio*), a CL₅₀ foi de 8,53 mg.L⁻¹, para o mesmo tempo de exposição (FISPQ, 2008), apesar de os dois trabalhos tratarem de espécies diferentes podemos observar que o volume utilizado de RT para matar 50% dos peixes foi cerca de 10 vezes menor que o de glifosato.

O Roundup Transorb® é classificado como medianamente tóxico (classe III) de acordo com a classificação toxicológica e classificado como perigoso ao meio ambiente de acordo com a classificação do potencial de periculosidade ambiental (BULA DO ROUNDUP TRANSORB®).

Embora seu consumo venha aumentando devido sua eficiência, a literatura sobre as propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas do Roundup Transorb® é escassa, pouco se sabe sobre ação desse produto no meio ambiente e em organismos aquáticos.

1.5 BIOINDICADOR

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA - resolução nº 357/2005) determina que a qualidade dos ambientes aquáticos seja avaliada por indicadores biológicos, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas como instrumentos para monitorar e avaliar a situação de corpos d'água. Os indicadores biológicos tem se mostrado muito úteis por sua especificidade em relação a certos tipos de impactos, pois muitas espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente ou, então, tolerantes a outros (WASHINGTON, 1984).

Assim, define-se como indicador ecológico ou bioindicador um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais de seu hábitat por sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996; VAN DER OOST, 2003).

Bioindicadores podem ser definidos, ainda, como organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental, alterando suas funções vitais ou acumulando agentes tóxicos. Esta definição pode ser ampliada ao se considerar que bioindicadores são organismos ou comunidades que reagem a alterações ambientais modificando suas funções vitais e/ou sua composição química e com isso fornecem informações sobre a situação ambiental (TOTTI *et al.*, 2007).

Como comentado anteriormente, em todo o mundo o uso de agroquímicos aumentou muito durante as últimas duas décadas, inclusive no Brasil, fazendo com que seu uso em excesso acumule resíduos nos ambientes aquáticos. Tal fato contribui para caracterizar peixes e, também, invertebrados

aquáticos como bons indicadores em estudos relacionados à contaminação aquática por agroquímicos, porque podem acumular agroquímicos em concentrações muito maiores do que as da água, já que estes compostos podem se ligar à matéria orgânica que é ingerida por esses animais (NIMMO, 1985).

Os peixes são excelentes para o estudo de potencial mutagênico e carcinogênico de contaminantes presentes na água, pois podem metabolizar, concentrar e armazenar poluentes (AL-SABTI *et al.*, 1994), constituindo assim, um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois estão presentes em vários ambientes, apresentam ampla distribuição geográfica e participam de diferentes níveis tróficos, sendo considerados excelentes modelos biológicos (RODRIGUES, 2003) e seu uso muito relevante em estudos de contaminação aquática por agroquímicos.

1.6 PROCHILODUS LINEATUS

Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1847) pertence à ordem dos peixes Characiformes, sub-ordem dos Characoidei e família dos Prochilontidae. Esse peixe (Figura 3), conhecido popularmente como curimba, possui o corpo recoberto por escamas e pode medir até 74 cm e pesar até 6 kg (CASTRO; VARI, 2003). É uma espécie reofílica, ou seja, migra na época reprodutiva, é detritívora e possui alta fecundidade.



Figura 3 – Juvenil de *Prochilodus lineatus*

Habita a região neotropical e é considerada uma das espécies mais abundantes e importantes da região Sul e Sudeste do Brasil, com maior frequência na porção superior da bacia do rio Paraná, principalmente nos rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu (LEONHARDT *et al.*, 2002). Nessas regiões esta espécie é muito utilizada na alimentação humana. Devido à sua importância econômica, por ter sua biologia bem conhecida e ser sensível a poluentes, este peixe é apropriado para testes de toxicidade (MARTINEZ; CÓLUS, 2002; CAMARGO; MARTINEZ, 2006).

Vários trabalhos consideram esta espécie de peixe como sendo um bioindicador em potencial (CAVALCANTE *et al.*, 2008, SIMONATO *et al.*, 2008; LANGIANO; MARTINEZ, 2008; CAZENAVE *et al.*, 2009), uma vez que a sua distribuição está restrita a locais pouco impactados e por se alimentarem de detritos, ficando expostos à substâncias químicas que possam ter ficado retidas nos sedimentos (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Um estudo realizado no Rio Tigabi-PR detectou a presença de *P. lineatus* ao longo do rio, com maior frequência em Sapopema e Ipiranga, que correspondem às regiões menos impactadas. Porém, não foram encontrados exemplares em Telêmaco Borba que é uma região onde se encontra uma indústria de papel e celulose; e apenas um exemplar dessa espécie foi coletado em Sertãoópolis, caracterizada por uma região com extensa atividade agrícola e ausência de mata ciliar e, portanto, potencialmente vulnerável à presença de agroquímicos (BENNEMANN *et al.*, 1995).

1.7 BIOMARCADORES

O termo biomarcador surgiu em 1987 e existem muitas definições para caracterizá-lo. Tipicamente, os biomarcadores são definidos como medidas quantitativas de mudanças no sistema biológico que respondem à exposição de xenobióticos que conduzem a efeitos biológicos. O uso do termo biomarcador está frequentemente restrito a mudanças celulares, bioquímicas,

molecular e/ou fisiológicas, medidas em células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição e/ou dos efeitos dos xenobióticos (LAM; GRAY, 2003).

Existem vários tipos de biomarcadores moleculares, celulares e ao nível de indivíduo (Figura 4). Suas características mais importantes são permitir a identificação das interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos e possibilitar a mensuração de efeitos sub-letais. Esta última característica permite colocar em prática ações remediadoras, ou ainda, ações preventivas. Essas características são importantes e tem despertado o interesse atual da incorporação de análises com biomarcadores em programas de avaliação da contaminação ambiental (JESUS *et al.*, 2008).



Figura 4 – Representação esquemática da ordem seqüencial ao estresse de poluentes dentro de um sistema biológico. Adaptado de VAN DER OOST, 2003.

A utilização de biomarcadores que fornecem sinais de alerta sobre o impacto ambiental requer a inclusão de mudanças biológicas que são indicativas de exposição a um agente específico (conhecido como biomarcadores de exposição), mesmo que essas mudanças não estejam diretamente ligadas à efeitos prejudiciais dos compostos tóxicos no organismo alvo (LAM; GRAY, 2003).

Os biomarcadores selecionados devem indicar que o organismo tem sido exposto a poluentes (biomarcadores de exposição) e/ou magnitude da resposta do organismo ao poluente (biomarcadores de estresse). A utilização de

biomarcadores celulares e moleculares é de grande importância como ferramenta sensível, de alerta precoce, para a medida do efeito biológico na avaliação da qualidade ambiental (CAJARAVILLE *et al.*, 2000).

Uma das características mais importantes dos biomarcadores celulares e moleculares é que eles têm potencial para antecipar as mudanças nos níveis mais elevados de organização biológica, ou seja, população, comunidade ou ecossistema. Assim, estes biomarcadores de "alerta precoce" podem ser usados de forma preditiva, permitindo o início de estratégias de biorremediação antes que ocorra um dano ambiental irreversível. Estas duas classes de biomarcadores são definidas como indicadores de curto prazo dos efeitos biológicos a longo prazo (CAJARAVILLE *et al.*, 2000).

Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e da exposição química, como por exemplo, exposição a agroquímicos. Um tipo de biomarcador que pode ser utilizado para esse tipo de avaliação é o genético, que busca o entendimento dos mecanismos relacionados à ação tóxica e o grau de resposta nos indivíduos (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores de peixes são excelentes ferramentas para monitorar a qualidade do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas modernos de monitoramento ambiental (WALKER *et al.*, 1996), porque possibilitam a detecção precoce dos problemas ambientais (FRENZILLI *et al.*, 2004). A utilização de biomarcadores de peixes se dá pelo fato de fornecerem informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes, fornecendo também pistas sobre os mecanismos de ação dos contaminantes, não correspondendo apenas à quantificação desses poluentes no ambiente. Assim, os biomarcadores podem ser usados para identificar sinais iniciais de danos aos peixes, sugerir as relações de causa-efeito entre a exposição aos contaminantes e os efeitos observados e documentar os efeitos integrados do estresse químico nos animais. Considerando-se ainda que muitos biomarcadores são indicadores rápidos de efeitos adversos crônicos, eles podem permitir a intervenção antes que efeitos prejudiciais irreversíveis tornem-se inevitáveis (MARTINEZ, 2006).

A utilização de parâmetros genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos como forma de avaliação da qualidade hídrica, permite

avaliar o efeito dos poluentes no ambiente aquático, como também alterações de seu potencial tóxico ou genotóxico após interação com o ambiente (PORTO *et al.* 2005). Os agentes genotóxicos podem agir diretamente, alterando a estrutura do DNA; esses efeitos podem incluir rupturas na cadeia de DNA, modificações nos nucleotídeos, aberrações cromossômicas e mutações de ponto (FRENZILLI *et al.*, 2004). Atualmente, os testes para detecção de substâncias genotóxicas são realizados mediante a avaliação de mutações gênicas, danos ao DNA, e alterações cromossômicas utilizando testes *in vitro* e testes *in vivo* (CASTRO, 2004).

Ao nível celular pode se utilizar, pelo menos, dois tipos de biomarcadores para indicar danos ao material genético, sendo eles o Ensaio do Cometa e o Teste do Micronúcleo (PORTO *et al.*, 2005). O Ensaio de Difusão do DNA, para análise da indução de apoptose e necrose (SINGH, 2000), pode ser inserido no trabalho como ferramenta para saber se o DNA está sendo reparado ou se as células estão morrendo frente ao contaminante. Ainda para fornecer informações adicionais visando compreender o mecanismo pelo qual compostos tóxicos no ambiente aquático podem causar danos indiretos ao DNA, tem se usado a integridade lisossômica, através da técnica do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro (BABICH; BORENFREUND, 1990) e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio acoplado à Capacidade Antioxidante (FRANCO, 2009).

1.7.1 Ensaio do Cometa

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é encontrado em todas as células dos organismos vivos e é o portador das informações hereditárias. Qualquer mudança na estrutura da molécula de DNA pode gerar sérias conseqüências biológicas. Alguns agentes ambientais químicos e/ou físicos são classificados como genotóxicos, ou seja, eles têm a capacidade de interagir e danificar a estrutura da molécula do DNA, muitas vezes causando um efeito adverso sobre sua integridade biológica (SHUGART, 2000), tais como,

modificações de base, quebras na fita, depurinação e crosslinks. A perda da integridade do DNA pode determinar, se não for devidamente reparado, a indução de mutações, aberrações cromossômicas, mal formação embrionária e efeitos a longo prazo, como câncer em animais vertebrados. Portanto, há interesse em avaliar o impacto de compostos genotóxicos liberados no ambiente aquático e existem hoje muitas metodologias para os ecotoxicologistas avaliarem esses impactos. O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador sensível de genotoxicidade e eficaz para o monitoramento ambiental (FRENZILLI *et al.*, 2004).

O ensaio do cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi aplicado pela primeira vez em ecotoxicologia há 15 anos, e se tornou um dos testes mais populares para a detecção de quebras na fita do DNA em animais aquáticos através de exposições *in vitro*, *in vivo* e *in situ* (OHE *et al.*, 2004), pois este teste pode avaliar dano e reparo no DNA (CASTRO, 2004; FAIRBAIRN, 1995). É uma técnica capaz de detectar danos no DNA em células individuais. É um ensaio relativamente novo, porém amplamente aplicado em estudos por ser facilmente realizado, possuir baixo custo e tempo reduzido para obtenção de resultados; além de permitir a detecção de danos diretos (PAZ-Y-MINO *et al.*, 2002) ou indiretos na molécula do DNA de organismos aquáticos por agentes genotóxicos presentes em ambientes aquáticos (MATSUMOTO *et al.*, 2006; VANZELLA *et al.*, 2007; JHA, 2008). Entre estes agentes genotóxicos presentes na água que são alvo de estudos, podemos destacar os agroquímicos, porque podem ser genotóxicos e/ou cancerígenos (AMORIM, 2003). Este ensaio é capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes, porém não é um teste de mutagenese, pois avalia a ocorrência de danos que são passíveis de reparos.

Os primeiros a quantificar os danos no DNA de células, usando uma técnica de eletroforese em microgel, foram Ostling e Johanson (1984). No entanto, o pH que eles usavam, permitia apenas a detecção de quebras no DNA dupla fita. Anos depois, o ensaio foi adaptado para condições alcalinas por Singh *et al.* (1988), o que deu origem a uma versão do ensaio do cometa mais sensível, que poderia avaliar tanto quebras de fita dupla, como quebras de fitas simples e

ainda sítios álcali-lábeis. Desde sua criação o ensaio tem sido modificado para poder avaliar os danos em vários tipos de células e em diferentes organismos, desde bactérias até seres humanos (DHAWAN *et al.*, 2009).

O ensaio do cometa de baseia no comportamento do DNA em células individualizadas levando em consideração sua organização dentro do núcleo. Para o DNA se compactar, após seu enovelamento com proteínas histônicas, ele precisa formar alças, as quais são aderidas à matriz nuclear. Assim, para este ensaio, as células embebidas em agarose devem ter suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares, incluindo histonas, extraídas com altas concentrações de sais. O DNA, que é maior e mais pesado que os outros componentes, ocupará o espaço no gel que estava preenchido por toda a célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, conhecida como nucleóide. O nucleóide é definido como uma série de alças superenoveladas de DNA desprovidos de histonas, aderidas à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula. Se existirem quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudanças causadas pelo desenovelamento das alças de DNA, formando um halo (GONTIJO; TICE, 2003).

Assim, as etapas do ensaio do cometa incluem a preparação de lâminas de microscopia com uma superfície de gel de agarose; suspensão de células embebidas em agarose de baixo ponto de fusão, que posteriormente serão colocadas nas lâminas previamente preparadas; etapa de lise, que rompe a membrana da célula, removendo o seu conteúdo citoplasmático e liberando o DNA; exposição a um tampão alcalino (pH > 13), para que o DNA nuclear seja desenrolado e ocorrer a abertura da dupla fita do DNA; eletroforese no tampão alcalino para migração do DNA fragmentado; neutralização das lâminas; coloração das lâminas com corante que se intercala no DNA e emite fluorescência e análise dos nucleóides em microscópio de fluorescência (TICE, 2000). O ensaio cometa é baseado na capacidade dos fragmentos de DNA carregados negativamente migrarem pelo gel de agarose em resposta a um campo elétrico. A extensão da migração desses fragmentos depende diretamente dos danos presentes nas células (KUMAVAREL *et al.*, 2009). A distância de migração dos fragmentos de DNA em relação aos nucleóides imobilizados se parece com a

cauda de um "cometa" (Figura 5). O aumento dos níveis de danos corresponde a um maior comprimento da cauda e uma redução do conteúdo de DNA nuclear (STEINERT, 1996).

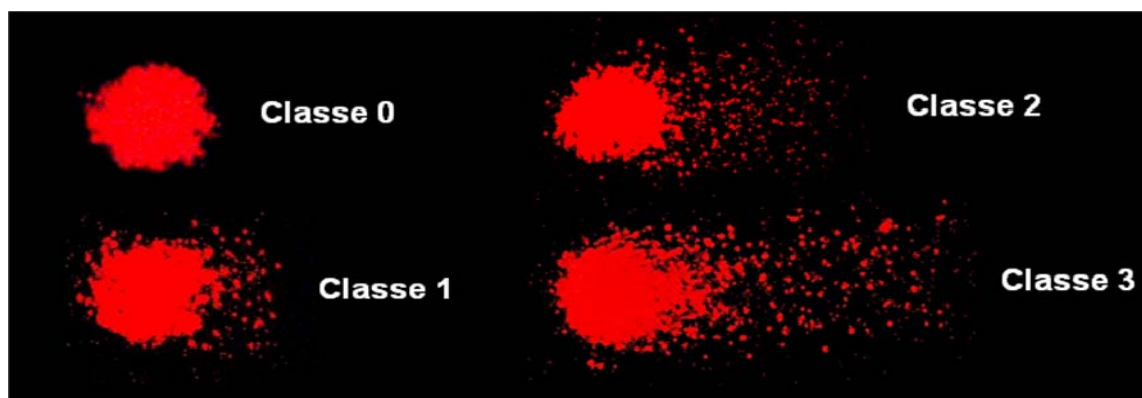


Figura 5 – Classes de danos verificados pelo Ensaio do Cometa no presente trabalho, classificados de acordo com Singh *et al.* (1988): 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) e 3 (muito dano).

Vários estudos têm indicado o ensaio do cometa como um método muito sensível e útil para a detecção de danos no DNA em estudos de laboratório e estudos de campo tanto com invertebrados aquáticos quanto com peixes (CONNERS; BLACK, 2004; VANZELLA *et al.*, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2008; GALINDO *et al.*, 2010, FEDATO *et al.*, 2010); além de ser um ensaio que pode ser aplicado em vários tecidos, tais como brânquia, fígado e sangue, tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro* (DHAWAN, 2009). A análise das alterações no DNA de organismos aquáticos tem se mostrado um método altamente adequado para avaliar os contaminantes genotóxicos dos ambientes, sendo capaz de detectar exposição a baixas concentrações de contaminantes, em uma ampla gama de espécies. Em geral, esses métodos têm vantagem de detectar o impacto genotóxico sem exigir um conhecimento detalhado das propriedades físico-química dos contaminantes presentes (FRENZILLI *et al.*, 2009).

1.7.2 Teste do Micronúcleo e Alterações Eritrocíticas Nucleares

Há mais de 20 anos a análise de micronúcleos (MN) tem servido como um índice de quebras cromossômicas, pois soma várias vantagens como simplicidade, confiabilidade e sensibilidade (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000). O teste do MN é amplamente utilizado para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos. Apesar da maioria dos trabalhos publicados até agora terem sido realizados com espécies de mamíferos (principalmente roedores), o teste do micronúcleo demonstrou ser uma ferramenta útil também com outras espécies (UDROIU, 2006).

Esta técnica foi desenvolvida originalmente para aplicação em ratos, e posteriormente Hoofman e de Raat modificaram a técnica para aplicação em peixes para experimentos em laboratório (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000), pois permite a avaliação da mutagênese ambiental dos compostos presentes no ambiente aquático. Como os peixes parecem responder a xenobióticos da mesma forma que os mamíferos, eles podem ser usados para testar as possíveis propriedades genotóxicas dos agentes químicos e físicos presentes no meio aquático (UDROIU, 2006). O número de micronúcleos tem sido utilizado como um índice de danos citogenéticos também em anfíbios e bivalves expostos a uma grande variedade de poluentes genotóxicos (PAVLICA, 2000).

Os MN são formados no citoplasma, durante a anáfase, quando um pedaço do cromossomo (evento clastogênico) (Figura 6) ou um cromossomo inteiro (evento aneugênico) (Figura 7), não se incorpora ao núcleo principal das células filhas ao final da divisão celular (AL-SABTI; METCALFE, 1995; PAVLICA, 2000; ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005; FRENZILLI, 2009). Como a formação dos MN só pode ser observada após a ocorrência da divisão celular, sua frequência depende do tempo que a célula leva para entrar em divisão, do tipo de tecido, da espécie que está sendo usada para o teste e das condições ambientais (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

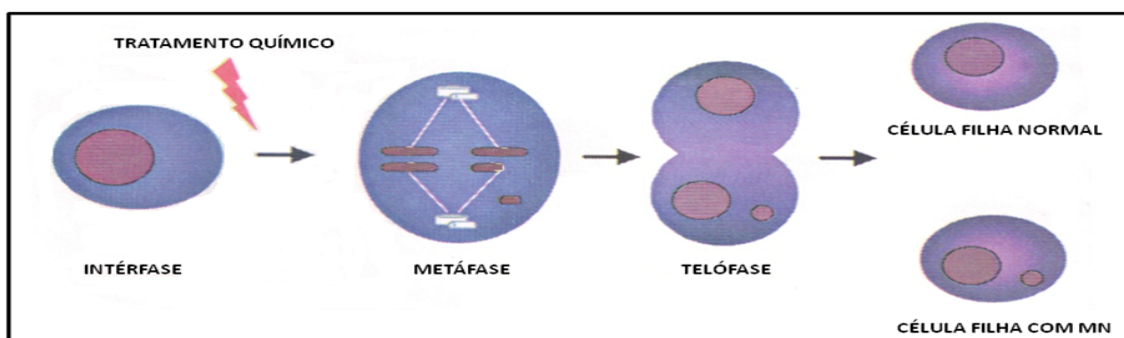


Figura 6 – Esquema mostrando a formação de um MN, através de um evento clastogênico (Ribeiro, 2003).

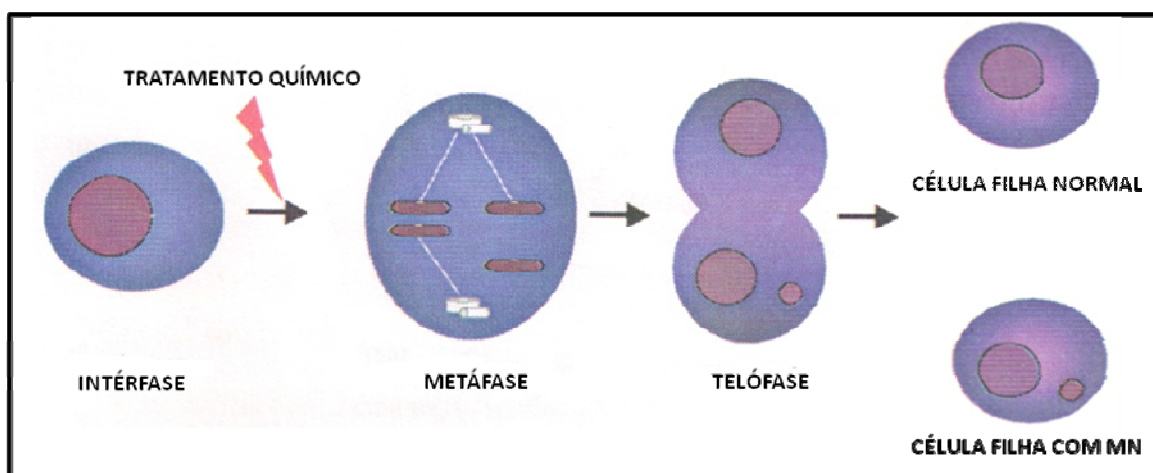


Figura 7 – Esquema mostrando a formação de um MN, através de um evento aneugênico (Ribeiro, 2003).

São considerados MN as estruturas circulares que possuem a mesma textura do núcleo principal e não estão ligadas a ele, que possuem um tamanho de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula e que não são refringentes (CARRASCO, 1999; AL-SABTI; METCALFE, 1995). No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, a proporção de tamanho pode ser de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Como os teleósteos possuem eritrócitos nucleados, a aplicação desse teste nessas células vem sendo bastante utilizada (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Os eritrócitos micronucleados dos órgãos hematopoiéticos refletem um dano genotóxico que ocorreu durante um tempo equivalente ao do ciclo celular, já

os da circulação periférica refletem eventos que ocorreram em tempo igual à da vida útil dos eritrócitos circulantes. O teste do MN não consiste apenas na observação da frequência de eritrócitos micronucleados. Para avaliar a frequência desses micronúcleos deve-se comparar os peixes que foram expostos a uma substância tóxica com peixes que foram submetidos à apenas água limpa (UDROIU, 2006).

Vários trabalhos utilizando eritrócitos periféricos de peixe mostraram aumento da frequência de micronúcleos depois de exposição, em laboratório, a diferentes tipos de poluentes (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA, 2002; ÇAVAS *et al.*, 2007; VENTURA *et al.*, 2008), sendo então, este teste um bom biomarcador para este tipo de estudo.

Em peixes, a expressão simultânea das alterações eritrocíticas nucleares (AEN) com o MN tem sido empregada, porém, os mecanismos pelas quais as AEN são formadas não estão totalmente explicados. Estas anormalidades são consideradas como sendo indicadores de danos genotóxicos e, por esse motivo, podem complementar a análise do MN nas pesquisas sobre genotoxicidade (ERGENE *et al.*, 2007). As AEN são classificadas como núcleos em constrição, lobulados e segmentados. Núcleo em constrição é caracterizado por uma pequena evaginação do núcleo; lobulado é caracterizado por evaginações maiores que as encontradas na constrição e segmentado é caracterizado por uma fenda bem definida, de largura uniforme, que provoca uma considerável profundidade para dentro do núcleo (Figura 8) (CARRASCO, 1999).

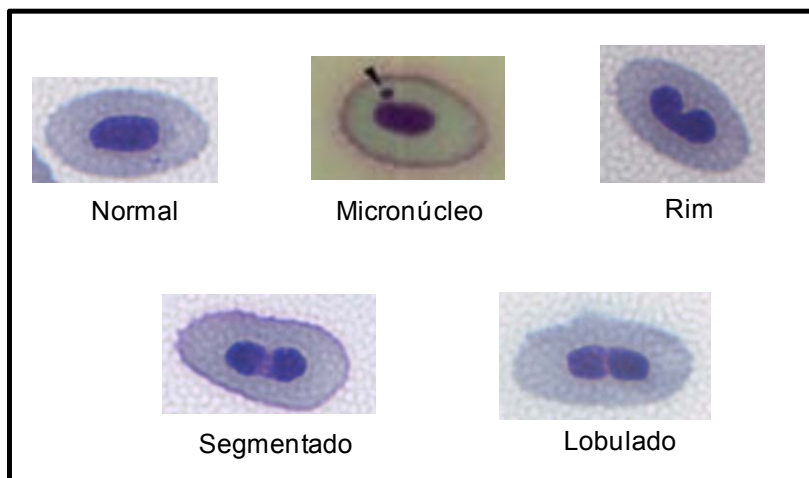


Figura 8 – Eritrócito normal, micronúcleo (foto do MN cedida pelo Laboratório de Ecofisiologia Animal), núcleo em forma de rim, segmentado e lobulado observados no presente trabalho e classificados de acordo com Carrasco (1999).

A análise de MN e AEN em peixes auxiliam na avaliação da qualidade da água bem como da saúde dos organismos aquáticos e o risco potencial dos contaminantes (TALAPATRA; BANERJEE, 2007); por esse motivo, essas duas análises juntas vêm sendo utilizadas em trabalhos com os mais variados contaminantes aquáticos, incluindo os herbicidas.

1.7.3 Ensaio de Difusão do DNA ou Teste do Halo

A morte celular tem sido assunto de grande interesse científico nos últimos anos e pode ocorrer pelo processo de apoptose ou necrose. A apoptose pode atuar como uma resposta fisiológica, que permite a remoção de células ou tecidos alterados, desempenhando um papel importante na manutenção da estrutura do órgão ou dos tecidos e impedindo que suas funções sejam alteradas por fatores externos (MELLO; CASTILHO, 2007); além de ser um processo crucial na eliminação de células cancerosas (SINGH, 2000). Quando o dano ao DNA, induzido por injúria química, ultrapassa a capacidade de reparo, os

processos de apoptose podem ser induzidos, aparecendo, então, durante a progressão da condição de estresse (STEINERT, 1996). A apoptose pode ser induzida por diferentes tipos de agentes estressores, como por exemplo, alguns metais, monóxido de carbono, pesticidas organofosforados, dioxinas, hidrocarbonetos poliaromáticos, radiação, entre outros (FRANCO *et al.*, 2009).

A necrose pode ser considerada como uma morte celular acidental, na qual, ocorrem falhas nas respostas adaptativas genéticas e metabólicas. Este tipo de morte celular pode ser induzida por injúrias severas, tais como privações de nutrientes, estresse oxidativo, sobrecarga intracelular de Ca^{2+} ou altas concentrações de substâncias tóxicas, que são responsáveis por gerar uma falha catastrófica no metabolismo (MELLO; CASTILHO, 2007).

Apoptose é caracterizada como uma sequência ordenada de eventos que leva a uma completa desmontagem da células. Já a necrose é caracterizada pelo inchaço da mitocôndria e imediata perda da integridade do plasma celular, a qual pode ser observada pela absorção da membrana que normalmente é impermeável (STEINERT, 1996). A apoptose é considerada, geralmente, como um processo dependente de energia, pois requer a participação ativa de muitas proteínas e outras macromoléculas celulares. Este processo parece ser induzido por leves estímulos genotóxicos. Quando a força do estímulo aumenta ocasiona a morte celular por necrose. Isto parece ser devido o fato de que muitos dos estímulos genotóxicos intensos podem danificar proteínas (ou genes que as codificam) e outras macromoléculas celulares necessárias para o processo de apoptose (SINGH, 2000).

Para avaliar se um composto químico é capaz de causar morte celular por apoptose ou necrose vem se utilizando o ensaio de difusão do DNA, conhecido também como teste do halo, que é caracterizado como um método simples, sensível e rápido para estimar apoptose e necrose em células isoladas. Este ensaio envolve a mistura das células com agarose e a confecção de uma lâmina com microgel. As células são lisadas com sais e detergentes para permitir a difusão de DNA, neutralizadas, fixadas, coradas com solução intercalante e analisadas em microscópio de fluorescência (SINGH, 2000). É um ensaio muito similar ao ensaio do cometa, porém sem a etapa de eletroforese. A identificação

das células apoptóticas e necróticas através desse ensaio é simples: as células apoptóticas têm o núcleo nebuloso, composto de restos nucleares e contorno indefinido sem uma divisão clara; já o núcleo das células necróticas é maior, pouco definido e tem um halo externo de aparência homogênea (Figura 9) (SINGH, 2000; BINELLI *et al.*, 2009).

Compreender como os fatores exógenos ambientais podem induzir a apoptose ou a necrose em organismos vivos (aquáticos e terrestres) é cada vez mais necessário (GOGAL JR, 2000), porém ainda são muito escassos os estudos que utilizam estes ensaios para avaliação da qualidade da água utilizando peixes como indicadores, pois a maioria desses estudos tem sido conduzidos utilizando células de mamíferos como modelo experimental.

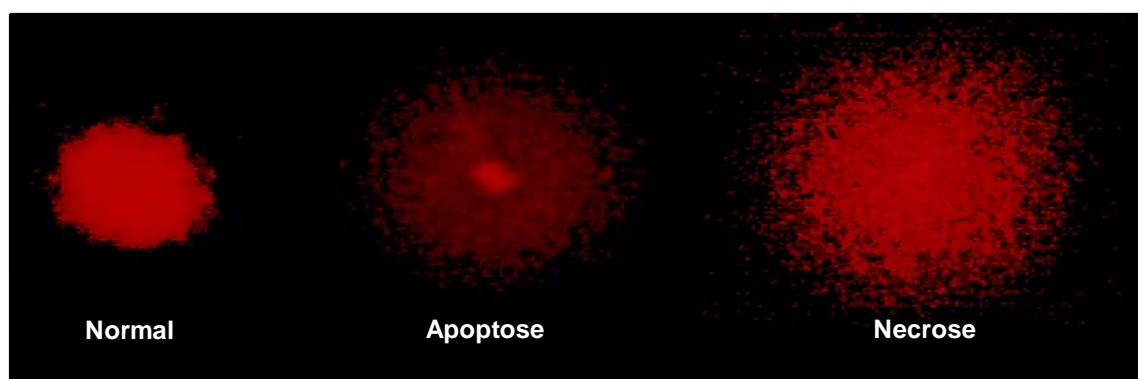


Figura 9 – Nucleóide normal, apoptótico e necrótico, observados no presente trabalho classificados segundo Singh (2000).

1.7.4 Espécies Reativas de Oxigênio

O ambiente aquático recebe diariamente quantidades substanciais de poluentes, que tem o potencial de causar estresse oxidativo para os organismos que vivem nesses ambientes, através da produção das espécies reativas de oxigênio (VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Os organismos aquáticos são mais sensíveis à exposição a compostos tóxicos, quando comparados com

organismos terrestres, incluindo mamíferos, e neste aspecto eles podem fornecer dados experimentais para avaliação de efeitos sutis causados por estresse oxidativo, mutagenicidade, e outros efeitos adversos que poluentes podem causar (LACKNER, 1998).

Poluentes químicos são importantes fontes de espécies reativas de oxigênio (ERO) no sistema biológico. Para a toxicologia os mais importantes são os xenobióticos, porque são capazes de alterar o ciclo redox e causar estresse oxidativo (REGOLI *et al.*, 2002; FRANCO, 2009). Dentre estes compostos capazes de causar estresse oxidativo estão os metais de transição, as quinonas, os corantes, os herbicidas e compostos nitro aromáticos (KAPPUS; SIES, 1981).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade das defesas antioxidantes de eliminar estas espécies tóxicas da célula (LIMÓN-PACHECO, 2009). Em muitos casos as ERO são referidas como radicais livres. Os radicais livres são definidos como uma molécula que possui um ou mais elétrons desemparelhados, em uma camada de valência externa e são capazes de existir independentemente (HERMES-LIMA, 2004; DI GIULIO; MEYER, 2008; FRANCO, 2009). As ERO incluem radicais livres derivados de oxigênio (O_2) como o radical ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) e o radical hidroxil ($\bullet OH$), e ainda espécies não-radicais, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FRANCO, 2009).

A existência de elétrons desemparelhados tende a tornar os radicais livres reativos, entretanto a faixa de reatividade entre os radicais livres é vasta. O $\bullet O_2^-$, por exemplo, é relativamente pouco reativo, enquanto o $\bullet OH$ é extremamente reativo e está entre o composto mais potencialmente deletério entre os radicais e ERO encontradas nas células (DI GIULIO; MEYER, 2008), sendo considerado o radical livre de maior importância biológica e toxicológica (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Os efeitos das ERO são amplos, entre eles podemos destacar três mecanismos relevantes envolvidos na injúria celular por estresse oxidativo, que são a modificação oxidativa de proteínas, lesões no DNA e a peroxidação de lipídios de membranas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Sabendo que as

ERO interagem com o DNA causando lesões, elas podem, então, estarem envolvidas em processos como a mutagênese, carcinogênese e na fragmentação da molécula de DNA (SIES, 1993).

Danos ao DNA têm sido observados em muitos tipos de células, desde invertebrados até mamíferos, em resposta a várias formas diferentes de estresse oxidativo (HERMES-LIMA, 2004). As lesões oxidativas no DNA são induzidas principalmente pelos radicais hidroxil ($\bullet\text{OH}$) que resultam da reação do H_2O_2 com o Fe^{2+} , conhecida como Reação de Fenton (Figura 7) (BJELLAND; SEEBERG, 2003). Esse tipo de lesão é possível devido à natureza polianiónica do DNA, que fornece uma aderência a cátions metálicos, facilitando, assim, a formação do H_2O_2 e do $\bullet\text{OH}$ adjacentes a molécula de DNA. Esses danos no DNA podem afetar as ligações das fitas da molécula de DNA promovendo quebras (OHE *et al.*, 2004).

A detecção de quebras no material genético pode ser uma ótima ferramenta no monitoramento dos efeitos subletais de poluentes em peixes, uma vez que existem testes, como por exemplo, o ensaio do cometa, que são sensíveis a esse tipo de dano (OHE *et al.*, 2004) e podem ser utilizados para complementar as análises das ERO.

O ataque das ERO à molécula de DNA pode causar, ainda, várias alterações em sua estrutura, entre elas temos as quebras na molécula, modificações de bases e a perda das bases purínicas, deixando os sítios apurínicos (HERMES-LIMA, 2004).

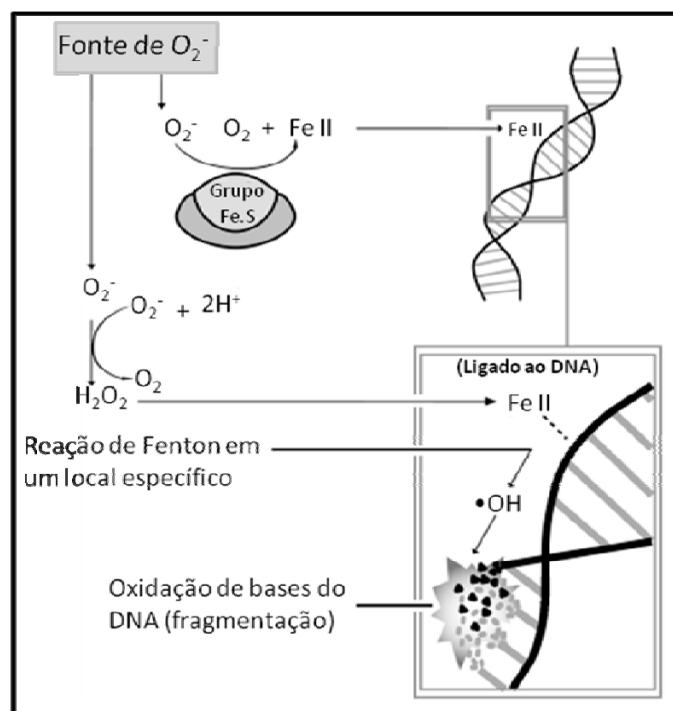


Figura 10 – O papel do ferro no dano oxidativo do DNA. Radicais superóxido formados a partir de fontes celulares (tais como mitocôndria e retículo endoplasmático) sofrem dismutação para H_2O_2 e também causam liberação de $Fe(II)$ a partir de proteínas que contém $Fe-S$. Quando o $Fe(II)$ se liga ao DNA reage com o H_2O_2 e produz reação de Fenton sítio-específica e formação de $\bullet OH$, levando ao dano oxidativo no DNA. Adaptado de Hermes-Lima, 2004.

Vários estudos têm demonstrado uma clara correlação entre o estresse ambiental, o estresse oxidativo e a apoptose, visto que o estresse oxidativo tem se mostrado ativar várias enzimas relacionadas com a apoptose. Danos oxidativos no DNA e o sistema de reparo (que pode falhar dependendo do estresse a que é submetido) são outros sinalizadores importantes, que ativam as cascatas que sinalizam a apoptose (FRANCO, 2009). O trabalho de revisão de Franco (2009) relata que vários estressores ambientais relacionam o estresse oxidativo com a apoptose, dentre esses estressores estão os vários tipos de metais e de partículas que ficam em suspensão na água, radiação, hidrocarbonetos poli-aromáticos e os pesticidas, dentre eles os herbicidas, que é o enfoque deste trabalho. Assim, ensaios que detectam o aparecimento de apoptose também servem como uma ferramenta adicional, assim como o ensaio do cometa, em estudos relacionados com a produção de ERO.

Visto a importância de avaliar a produção de ERO, em peixes, expostos a diversos tipos de xenobióticos, foi desenvolvido um método simples, rápido e confiável para a determinação das ERO. Este método é baseado na detecção de ERO por fluorometria, empregando o 2',7' diacetato diclorofluoresceína (H₂DCF-DA) como substrato, que é oxidado pelas ERO, transformando-o em um composto fluorescente, o DCF (diclorofluoresceína), a qual é detectado em um comprimento de onda de 488 nm, para excitação e 525 nm para emissão (AMADO, 2009).

Com esta metodologia de detecção da produção de ERO, pode-se verificar, também, a Capacidade Antioxidante Total do tecido. Esta análise fornece informações sobre a capacidade do sistema de defesa antioxidante dos tecidos, de neutralizar as ERO. Para esta avaliação, utiliza-se a decomposição térmica do 2,2' azobis (2 metilpropionamídio) dihidroclorido (ABAP), que gera radicais peroxil a 35°C. Assim, a capacidade total de absorbância dos radicais peroxil dos tecidos é monitorada pela fluorescência emitida pela reação entre as ERO e o H₂DCF-DA. Devido à alta temperatura utilizada no ensaio, o sistema de defesa que possivelmente está ativo é o não-enzimático (GSH, ácido ascórbico, ácido urino, vitamina E, etc.), já que a alta temperatura desnatura as enzimas (AMADO, 2009).

1.7.5 Tempo de Retenção do Vermelho Neutro

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas, que acumulam cerca de 40 enzimas hidrolíticas em seu interior, como por exemplo, nucleases, fosfatases, glicosilases, arilsulfatases, collagenases, captasinas e fosfolipases. Tem como principal função a digestão intracelular, permitindo que as células eliminem porções envelhecidas ou danificadas do citoplasma, incluindo organelas e moléculas, e degradam, também, fragmentos de membrana plasmática, macromoléculas, partículas, outras células ou até microrganismos (AZEREDO-OLIVEIRA; CARVALHO, 2007).

O sistema lisossomal tem sido identificado como alvo dos efeitos tóxicos de contaminantes, e as alterações patológicas nos lisossomos, decorrente desses efeitos, têm sido especialmente úteis na identificação dos efeitos adversos dos impactos nos organismos aquáticos (MOORE, 1990).

Devido o lisossomo ser uma organela responsável pela remoção de compostos tóxicos do citosol (STEFANONI; ABESSA, 2008), a avaliação da estabilidade da membrana lisossomal vem sendo utilizada como um biomarcador celular para verificar estresse decorrente de poluição (NICHOLSON; LAM, 2005), pois a integridade da membrana lisossomal e sua estabilidade costumam ser afetadas por substâncias estressoras (MOORE *et al.*, 2006).

Para avaliar a integridade e a estabilidade da membrana lisossomal foi desenvolvido o ensaio conhecido como tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN). Esta técnica vem sendo empregada para avaliar as alterações na permeabilidade da membrana lisossomal causadas por poluentes ambientais (KOUKOUZIKA; DIMITRIADIS, 2005). O ensaio TRVN apresenta diversas vantagens, tais como simplicidade, rapidez, reprodutibilidade, baixo custo e sensibilidade, além de ser uma ferramenta útil para a detecção e quantificação das injúrias que podem ser causadas pelos poluentes (BABICH; BORENFREUND, 1991).

Inicialmente o ensaio TRVN foi desenvolvido para avaliar a citotoxicidade, *in vitro*, baseado no uso de cultura de células de mamíferos. Com a crescente preocupação relacionada com a contaminação aquática, esta metodologia foi, posteriormente, adaptada para estudos de ecotoxicidade, utilizando cultura de células de peixes (BABICH; BORENFREUND, 1990).

O ensaio TRVN é baseado na incorporação de um corante, o vermelho neutro, pelos lisossomos de células viáveis, depois de sua incubação com compostos tóxicos químicos. O corante, que é fracamente iônico, penetra nas membranas das células por difusão não iônica e se liga intracelularmente na matriz dos lisossomos (BABICH; BORENFREUND, 1991). Apenas os lisossomos de células saudáveis conseguem reter o corante catiônico depois da captação inicial. Em células em que a integridade da membrana lisossomal foi prejudicada, por exposição a substâncias químicas, o corante vermelho neutro é capaz de sair

dos lisossomos e entrar em contato com o citoplasma da célula, deixando-a vermelha (SVENDSEN, 2004).

O tempo que o corante leva para atingir o citosol está relacionado com o grau de dano nas membranas (LOWE; PIPE, 1994). Os xenobióticos podem interagir com a membrana lisossomal diminuindo a retenção do corante, e posteriormente sua absorção, devido à desestabilidade criada na membrana (BABICH; BORENFREUND, 1991). O excesso de substâncias exógenas pode diminuir a permeabilidade da membrana, levando ao efluxo das enzimas hidrolíticas (NICHOLSON, 2001), que foram comentadas anteriormente. Essas enzimas podem interagir com fosfolipídios, proteínas, grupamentos fosfatos, RNA e também com o DNA, causando danos à molécula.

Esta metodologia tem sido aplicada para a avaliação da toxicidade de vários compostos químicos, incluindo metais, produtos farmacêuticos e compostos orgânicos ambientais (BABICH; BORENFREUND, 1991), porém a grande maioria dos estudos ainda utiliza células de mamíferos. Contudo, ainda são raros os estudos *in vitro* que utilizam eritrócitos de peixes, para avaliar se os herbicidas podem causar a desestabilização da membrana dos lisossomos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar se exposições agudas ao glifosato e ao herbicida Roundup Transorb® promovem efeitos genotóxicos, citotóxicos e/ou mutagênicos para a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, empregando-se testes *in vivo* e *in vitro*;
- Comparar os efeitos do princípio ativo glifosato e do Roundup Transorb®, para verificar o papel do princípio ativo na toxicidade do produto formulado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de toxicidade aguda (6, 24 e 96 h) com *P. lineatus* expostos ao glifosato e ao Roundup Transorb®;
- Investigar os possíveis efeitos genotóxicos dos produtos testados empregando-se o ensaio do cometa com eritrócitos e células branquiais de *Prochilodus lineatus* após os testes de toxicidade aguda;
- Averiguar os possíveis efeitos mutagênicos dos produtos testados, empregando-se o teste do micronúcleo em eritrócitos de *P. lineatus* após os testes *in vivo*;
- Realizar testes *in vitro* com eritrócitos de *P. lineatus* expostos ao glifosato e ao Roundup Transorb® durante 1, 3 e 6 h;
- Verificar os possíveis efeitos genotóxicos dos produtos testados através do ensaio do cometa com os eritrócitos expostos aos testes *in vitro*;

- Pesquisar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ERO) nos possíveis mecanismos de genotoxicidade do glifosato e Roundup Transorb®;
- Examinar a indução de apoptose e/ou necrose nos eritrócitos expostos aos testes *in vitro*, empregando-se a metodologia do ensaio de difusão do DNA;
- Avaliar a integridade da membrana lisossomal dos eritrócitos expostos aos testes *in vitro*, empregando-se o ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro.

**3 ARTIGO A: EFEITOS GENOTÓXICOS DO HERBICIDA ROUNDUP
TRANSORB® E DO SEU PRINCÍPIO ATIVO GLIFOSATO PARA O PEIXE
*PROCHILODUS LINEATUS***

Natália Cestari Moreno¹, Silvia Helena Sofia¹, Claudia B R Martinez^{2*}

¹*Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina*

²*Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina*

Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 – Km 380 – Campus Universitário

Cx. Postal – 6001 CEP – 86051-990

Londrina – PR – Brasil

Telefone: 55-43-3371-4437

E-mail: cbueno@uel.br

* Autor para Correspondência

Artigo a ser submetido ao periódico *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

Resumo

Este trabalho foi desenvolvido para investigar se o glifosato e seu produto formulado, o herbicida Roundup Transorb® (RT), interagem com a molécula de DNA dos eritrócitos e das células branquiais do peixe *Prochilodus lineatus*, utilizando como ferramentas para esta avaliação o ensaio do cometa (eritrócitos e células branquiais), o teste do micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocíticas nucleares (AEN) (eritrócitos). Para tanto, foram utilizados juvenis de *P. lineatus* expostos a duas concentrações (1 e 5 mg.L⁻¹) de glifosato e RT ou apenas à água desclorada (controle negativo ou CN), durante 6, 24 e 96 h. Os resultados do ensaio do cometa mostraram que os eritrócitos dos peixes expostos ao glifosato, por 6 e 96 h, e ao RT, por 24 e 96 h, nas duas concentrações, apresentaram escore de danos no DNA significativamente maior que os respectivos CN. Para as células branquiais o glifosato foi genotóxico apenas em 6 h na maior concentração e o RT apenas em 24, nas duas concentrações testadas. No teste do micronúcleo tanto o glifosato quanto o RT não induziram a ocorrência de MN nos eritrócitos, tão pouco a ocorrência de outras AEN foi significativamente maior que no CN. Esses resultados mostraram que tanto o glifosato quanto o RT causam danos à molécula de DNA dos eritrócitos e das células branquiais de *P. lineatus*, por outro lado, o princípio ativo e o produto formulado, nesses mesmos testes, não exerceram efeito mutagênico no DNA dos eritrócitos.

Palavras-chave: DNA. Ensaio do Cometa. Teste do Micronúcleo. Eritrócitos. Células branquiais.

1 INTRODUÇÃO

As atividades agrícolas cada vez mais intensivas fizeram com que a utilização de agroquímicos aumentasse em todo o mundo. O uso generalizado desses compostos pode resultar na presença de seus resíduos em várias matrizes ambientais, principalmente nos ambientes aquáticos, já que podem atingir as águas superficiais, a partir de campos agrícolas por escoamento superficial [1].

Desde a década de 1970 o glifosato [N-(fosfometil)glicina] é o agroquímico de maior participação no mercado mundial, devido à sua eficiência no controle de plantas invasoras [2, 3, 4, 5]. O glifosato age na planta inibindo a ação da enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintase (EPSP), que interrompe a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, fazendo com que as plantas

morram em poucos dias ou semanas [6, 7]. A grande utilização de glifosato é em parte explicada devido a sua aplicação em culturas de plantas geneticamente modificadas, conhecidas como Roundup Ready [2]. Essas plantas possuem em seu genoma o gene Roundup Ready, que confere a elas resistência a molécula de glifosato, impedindo que a ação da enzima EPSP seja bloqueada, assim a via metabólica não é interrompida e as plantas se desenvolvem normalmente [8].

O Roundup® e seus produtos formulados são os agroquímicos a base de glifosato mais utilizados para o controle de plantas invasoras terrestres [3]. Entre essas formulações podemos destacar o Roundup Transorb® (RT), que foi desenvolvido para ser aplicado em períodos de chuva devido a sua absorção pela planta ser de apenas uma hora, enquanto as outras formulações do Roundup® necessitam de pelo menos quatro horas para serem absorvidas [5].

O RT possui em sua fórmula glifosato (48 g.L^{-1}) e ingredientes inertes [9]. Os ingredientes inertes se referem ao surfactante, cuja fórmula não é divulgada pelo fabricante; o que a literatura reporta é que se trata de uma mistura de surfactantes contendo 15% de polietoxileno amina (POEA) [10]. Este agroquímico é classificado como medianamente tóxico (classe III), de acordo com a classificação toxicológica; e como perigoso ao meio ambiente, de acordo com a classificação do potencial de periculosidade ambiental [9].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde a toxicidade do glifosato é baixa [11]. Entretanto, os produtos formulados a base de glifosato são geralmente mais tóxicos [6, 12], principalmente devido à adição de surfactantes [13]. Em um estudo realizado por Rodrigues e Almeida [5] foi verificado que a CL_{50} (96h) do glifosato para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é de 86 mg.L^{-1} ; enquanto que Langiano e Martinez [14] observaram que a CL_{50} (96h) do herbicida Roundup® para juvenis de *Prochilodus lineatus* é $13,69 \text{ mg.L}^{-1}$ e em um trabalho com o RT, utilizando o peixe paulistinha (*Danio rerio*), a CL_{50} (96h) encontrada foi de $8,53 \text{ mg.L}^{-1}$ [15]. Apesar de os três trabalhos tratarem de espécies diferentes pode-se observar que o volume de Roundup® e RT necessário para promover a morte de 50% dos peixes foi cerca de 10 vezes menor que o de glifosato.

Levando-se em consideração que o uso de agroquímicos à base de glifosato aumentou muito durante as últimas duas décadas, inclusive no Brasil, seus resíduos são poluentes que podem ser encontrados com frequência no meio ambiente [16], entre os quais podemos destacar o ambiente aquático. Este fato contribui para caracterizar peixes como bons indicadores em estudos relacionados à contaminação aquática por agroquímicos, porque estes organismos podem acumular pesticidas em concentrações muito maiores do que as da água, já que estes compostos podem se ligar à matéria orgânica que é ingerida por estes animais [17]. O peixe *Prochilodus lineatus* é considerado como sendo uma espécie bioindicadora em potencial [18, 14, 19], por sua distribuição estar restrita a locais pouco impactados e por se alimentarem de detritos, ficando expostos às substâncias químicas que possam estar aderidas ao sedimento [20]. Essa espécie também é considerada como uma espécie neotropical promissora para a avaliação de substâncias potencialmente mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas [21].

Uma forma de avaliar os efeitos de compostos tóxicos sobre os peixes é por meio da utilização de biomarcadores, dentre eles, os moleculares e os celulares. As características mais importantes desses tipos de biomarcadores são que permitem a identificação das interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos, e ainda possibilitam a mensuração de efeitos sub-letais, que permitem colocar em prática ações remediadoras ou preventivas. Devido à importância das características desses biomarcadores, eles já vêm sendo utilizados em programas de avaliação da contaminação ambiental [22].

Existem atualmente muitas metodologias para se avaliar o impacto de compostos genotóxicos liberados no ambiente aquático. O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador de genotoxicidade sensível e eficaz para o monitoramento ambiental [23]. Ao nível celular podemos utilizar pelo menos dois tipos de biomarcadores para indicar danos ao material genético, sendo eles o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo [24].

O ensaio do cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi aplicado pela primeira vez em ecotoxicologia há 22 anos. Desde então se tornou um dos testes mais utilizados para avaliação de quebras na fita do DNA

em animais aquáticos, em exposições *in vivo*, *in vitro* e *in situ* [25], pois esta técnica é capaz de avaliar dano e reparo na molécula de DNA [26], além de permitir a detecção de danos diretos [27] ou indiretos [28, 29, 30]. Este teste avalia danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes [26]. Vários tecidos podem ser utilizados neste ensaio, tais como, brânquia, fígado e sangue [31]. Alguns trabalhos têm indicado o ensaio do cometa como um método sensível e útil para a detecção de danos no DNA em estudos de laboratório utilizando o peixe *Prochilodus lineatus* [21, 29, 32].

O teste do micronúcleo (MN) é amplamente utilizado para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos, permitindo a avaliação do potencial mutagênico de diversos compostos presentes no ambiente aquático [33]. Alguns trabalhos utilizando eritrócitos de peixes mostraram aumento da frequência de micronúcleos depois da exposição, em laboratório, a diferentes tipos de poluentes, tais como os agroquímicos Imazapir, glifosato, Roundup e Atrazina [34, 35, 36, 37]. Em peixes, a expressão simultânea das alterações eritrocíticas nucleares (AEN) com o MN tem sido empregada, porém, os mecanismos pelas quais as AEN são formadas não estão totalmente explicados, mas essas anormalidades são consideradas como sendo indicadores de danos genotóxicos e, por esse motivo, podem complementar a análise do MN nas pesquisas sobre genotoxicidade [38]. Assim, a análise de MN e AEN em peixes podem auxiliar na avaliação da qualidade da água, na saúde dos organismos aquáticos e do risco potencial dos contaminantes [39].

Com base no exposto surgiu o interesse em comparar a genotoxicidade do princípio ativo glifosato, com a do produto formulado RT, com a finalidade de elucidar se o surfactante da fórmula do RT pode exercer efeitos tóxicos sobre a molécula de DNA, já que sua composição não é divulgada. Acredita-se que a toxicidade mais elevada do RT muito provavelmente se deva à adição de surfactantes para aumentar a eficácia do produto [3], entretanto, ainda são raros os trabalhos que compararam os efeitos do princípio ativo da fórmula com o do produto formulado a fim de avaliar a toxicidade de cada um deles e ainda verificar se o princípio ativo contribui para essa possível toxicidade.

Assim, no presente trabalho foi utilizado o ensaio do cometa e a análise de ocorrência de micronúcleos e outras AEN com o intuito de investigar se o glifosato e se o produto formulado, o herbicida Roundup Transorb® (RT), exercem efeitos genotóxicos em eritrócitos e células branquiais do peixe *Prochilodus lineatus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ACLIMATAÇÃO

Foram utilizados indivíduos juvenis da espécie de peixe *Prochilodus lineatus*, com tamanho entre 7,3 e 10,5 cm e peso entre 7,1 e 11 g, fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina. Os peixes foram aclimatados por sete dias em tanques de 300 litros, preenchidos com água desclorada (temperatura: $\approx 23^{\circ}\text{C}$; pH: ≈ 7.3), continuamente aerada, sob foto-período de 12 h /12 h e foram alimentados a cada 48 h, exceto no dia anterior ao início dos testes de toxicidade e durante os mesmos.

2.2 TESTES DE TOXICIDADE

Após o período de aclimação, foram formados quatro grupos de seis animais cada, sendo eles: controle-negativo (CN), experimental (1 mg.L^{-1} e 5 mg.L^{-1}) e controle-positivo (CP). Estes grupos foram mantidos em aquários de vidro de 100 litros com água desclorada e continuamente aerados, para que fossem realizados os experimentos de exposição aguda.

Os testes de toxicidade aguda foram realizados durante os tempos de 6, 24 e 96 horas, com as concentrações de 1 mg.L^{-1} e 5 mg.L^{-1} para o Roundup Transorb® (Monsanto). Para o glifosato (Sigma-Aldrich; CAS n° 1071-83-6) também foram utilizadas as mesmas concentrações, levando em consideração a quantidade deste sal na fórmula do Roundup Transorb® (48 g.L^{-1}). Para a realização dos testes de toxicidade um grupo de peixes foi exposto

somente a água (CN), outro exposto a água contendo 1 mg.L^{-1} do glifosato ou do RT, assim como, um terceiro exposto a água contendo 5 mg.L^{-1} do glifosato ou do RT e um quarto grupo que constituiu o controle positivo (CP), no qual os indivíduos receberam injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (0,04 mg de ciclofosfamida/g de animal). Para receber essa injeção, os indivíduos foram anestesiados e pesados antes da aplicação. Em seguida, os peixes foram transferidos para aquários de vidro, contendo água nas mesmas condições dos CN.

Após cada período de exposição os peixes foram retirados dos aquários e anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) para a coleta de sangue da veia caudal. Em seguida, os animais foram sacrificados por secção medular para a retirada das brânquias. Foram utilizados $10 \mu\text{L}$ de sangue para a realização do ensaio do cometa. Esta alíquota de sangue foi armazenada em microtubos de $1,5 \text{ mL}$, contendo $700 \mu\text{L}$ de PBS (NaCl $126,6 \text{ mM}$, KCL $4,8 \text{ mM}$, CaCl $1,5 \text{ mM}$, NaHCO₃ $3,7 \text{ mM}$, Na₂HPO₄ $8,9 \text{ mM}$, NaH₂PO₄ $2,9 \text{ mM}$) e mantida no gelo até o momento da realização do teste. Foram utilizados mais $10 \mu\text{L}$ de sangue para o esfregaço das lâminas para o teste do micronúcleo.

Após a remoção e a limpeza das brânquias, os filamentos branquiais foram retirados e transferidos para microtubos, contendo 1 mL de PBS, que foram mantidos no gelo até a dissociação celular. A metodologia para a preparação da suspensão celular foi baseada no protocolo de Kilemade *et al.* [40], com modificações de Cavalcante *et al.* [32]. Os filamentos branquiais foram seccionados e transferidos para microtubos contendo tripsina $0,05\%$ preparada em PBS livre de cálcio e magnésio (KCL $2,68 \text{ mM}$, KH₂PO₄ $1,47 \text{ mM}$, NaCl $136,89 \text{ mM}$, Na₂HPO₄ $8,10 \text{ mM}$), onde permaneceram por 15 minutos. Após esse tempo foi adicionado soro bovino fetal e em seguida, o material foi centrifugado a 56 g por 10 min , e o pellet foi ressuscitado em $30 \mu\text{L}$ de PBS para a montagem do ensaio do cometa.

2.3 VIABILIDADE CELULAR

Para a realização do ensaio do cometa a viabilidade celular foi avaliada, pelo método de exclusão do corante azul de Trypan (Trypan 1% - 1g de Trypan em 100 mL de PBS). Para tanto, um volume de 10 μ L de amostra foi misturado em 50 μ L do corante e analisados em câmara de Neubauer espelhada, discriminando-se as células viáveis (incolores) e as células inviáveis (azuis). Os ensaios só foram realizados com amostras apresentando viabilidade de no mínimo 80% (TICE *et al.*, 2000).

2.4. ENSAIO DO COMETA

A metodologia empregada no ensaio do cometa alcalino foi baseado no protocolo de Singh *et al.* [41]. Para os testes com as células sanguíneas e branquiais, 10 μ L e 15 μ L da suspensão celular, respectivamente, foram adicionadas em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (100 mg em 20 mL de PBS livre de cálcio e magnésio) para a confecção das lâminas. O volume total da suspensão foi dividido em duas lâminas de vidro, preparadas previamente com agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL PBS livre de cálcio e magnésio), e codificadas para análise posterior. Após serem cobertas com lamínula, as lâminas foram colocadas em geladeira (4°C) por 30 min, para a completa solidificação da agarose com as células.

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi removida e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 h. Após a lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução tampão alcalina (0,3 N NaOH; 1 mM EDTA, pH > 13), onde permaneceram por 30 minutos, dentro de um recipiente escuro contendo gelo. Em seguida, as lâminas foram exposta a eletroforese por 20 min, a 300 mA, a 25V e a 1Vcm^{-1} . Após a eletroforese, as lâminas foram cobertas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Este passo foi repetido por mais 2 vezes. Após a terceira neutralização, as lâminas foram secas em posição

inclinada e fixadas com etanol durante 10 minutos. Depois de fixadas, as lâminas foram armazenadas na temperatura de 4°C, por no máximo 30 dias, até a realização das análises.

Para as análises, as lâminas foram coradas com GelRed (15 µl de GelRed diluído em 45 mL de água destilada e 5 mL de NaCl 1M) e analisadas em microscópio de fluorescência. Foram analisados 100 nucleóides por animal e os danos no DNA foram classificados, de acordo com Kobayashi *et al.* [42], considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. Para o cálculo do escore de dano, o número de nucleóides em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e 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 nucleóides em cada uma das classes. Assim, o escore total para os nucleóides analisados 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 dos nucleóides com danos (classes 1, 2 e 3).

2.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo (MN) foi realizado de acordo com a metodologia de Hoofman e Raat [43]. As lâminas utilizadas nesta metodologia foram previamente lavadas com água destilada e detergente. Para o MN foram confeccionados esfregaços em duas lâminas, com 5 µL sangue coletados de cada indivíduo, que foram secos em temperatura ambiente e protegidos de luz por 24 h. Após esse período, as lâminas foram fixadas com metanol absoluto por 10 min e coradas com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato (0,06M Na₂HPO₄, 0,06M KH₂PO₄, pH 6,8), durante 20 min. Depois da etapa de coloração, as lâminas foram preparadas com a fixação de uma lamínula.

As análises dos MN e AEN foram realizadas em microscópio de luz, sob a objetiva de 100x. Para cada animal, foram analisados 3000 eritrócitos, anotando-se as freqüências de micronúcleos e também a presença de alterações nos núcleos das células. Assim como na metodologia do Cometa as lâminas foram codificadas para evitar uma análise tendenciosa.

A classificação das AEN foi baseada em Carrasco *et al.* [44] e foram considerados: 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 foram apresentados como número de eritrócitos com MN ou com alterações, para cada 1000 células analisadas (em ‰). As análises comparativas foram feitas separadamente para os resultados de MN e AEN. Para a comparação da ocorrência de AEN entre os diferentes grupos experimentais considerou-se a soma dos eritrócitos com NS+NL+NR por animal.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nas metodologias descritas acima para o grupo CN, experimental (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) e CP, em um mesmo tempo de exposição, foram comparados entre si pela análise de variância - critério único (ANOVA), seguida de teste de comparações múltiplas SNK (Student-Newman-Keuls), quando necessário. Foram considerados significativos os valores de P < 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 DANOS NO DNA AVALIADOS PELO ENSAIO DO COMETA

Os resultados encontrados para o ensaio do cometa, com células branquiais, mostraram que o escore médio de danos do DNA, dos animais expostos a concentração de 1 e 5 mg.L⁻¹ de glifosato foi significativamente maior em relação ao seu respectivo CN, apenas no tempo de exposição de 6 h (Figura

1). Os valores de escore de dano determinados para o grupo CP, composto por peixes que receberam a injeção com ciclofosfamida, foram significativamente maiores em relação aos CN dos três tempos experimentais (Figura 1).

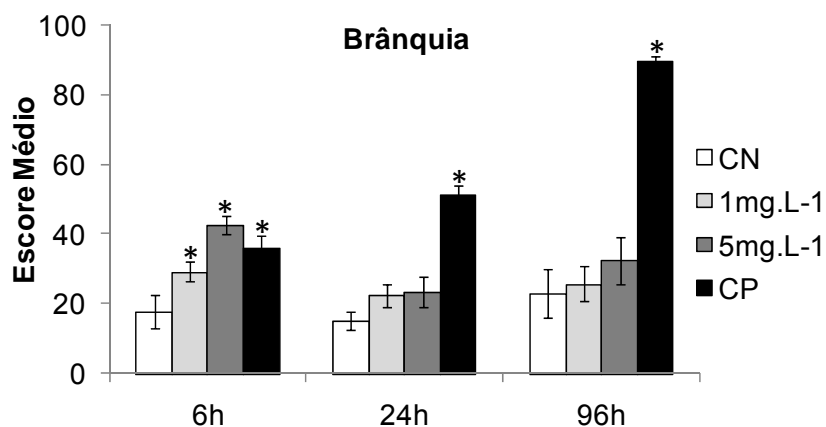


Figura 1 – Escores de dano em células branquiais de *P. lineatus*, expostos apenas à água (CN) ou ao glifosato (1 mg.L^{-1} e 5 mg.L^{-1}) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN ($P < 0,05$).

Tabela 1 – Frequência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados (média ± EP) em células branquiais de *P. lineatus* expostos apenas à água (CN) ou ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos (%)					Total de nucleóides danificados (média ± EP)
			N	0	1	2	3	
Brânquia	6h	CN	6	84,0	4,2	1,8	0,0	16,0 ± 4,0
		1 mg.L ⁻¹	4	71,0	22,0	6,6	0,2	28,8 ± 3,4*
		5 mg.L ⁻¹	6	70,0	19,0	10,0	3,0	30,0 ± 2,4*
		CP	4	70,2	9,8	0,0	0,0	29,3 ± 4,7*
	24h	CN	4	80,8	6,7	2,5	0,0	19,2 ± 7,1
		1 mg.L ⁻¹	6	79,8	8,0	2,2	0,0	20,2 ± 1,5
		5 mg.L ⁻¹	6	78,0	0,0	2,0	0,0	22,0 ± 3,0
		CP	6	49,2	0,2	0,7	0,0	50,8 ± 2,1*
	96h	CN	4	71,2	8,8	0,0	0,0	28,8 ± 8,4
		1 mg.L ⁻¹	4	82,8	7,2	0,0	0,0	17,2 ± 6,6
		5 mg.L ⁻¹	6	72,0	3,8	3,4	0,6	27,8 ± 4,0
		CP	5	15,0	4,8	0,2	0,0	85,0 ± 1,3*

Os valores representam a média ± EP. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,01).

Nas análises do número de nucleóides danificados das células branquiais, foi encontrado tanto para os peixes expostos à concentração de 1 mg.L⁻¹ quanto 5 mg.L⁻¹ de glifosato, valores significativamente maiores em relação ao seu CN, no tempo de 6 h. Este aumento de danos nos nucleóides não foi verificado em 24 e 96 h. Um aumento significativo de nucleóides danificados do CP em relação ao CN foi verificado nos três tempos de exposição (Tabela 1).

Os resultados obtidos com os peixes expostos ao RT mostraram que os escores de danos no DNA de células branquiais de *P. lineatus*, após 6 h de exposição às duas concentrações de RT, não diferiram significativamente do CN. Por outro lado, após 24 h de exposição às duas concentrações de RT, foram observados aumentos significativos nos escores de dano, em relação ao respectivo CN. Já no tempo de exposição de 96 h, os valores de escore médio

das duas concentrações estudadas voltaram ao nível basal. Nos três tempos experimentais os animais do grupo CP apresentaram escores de danos nas brânquias significativamente maiores que o CN (Figura 2).

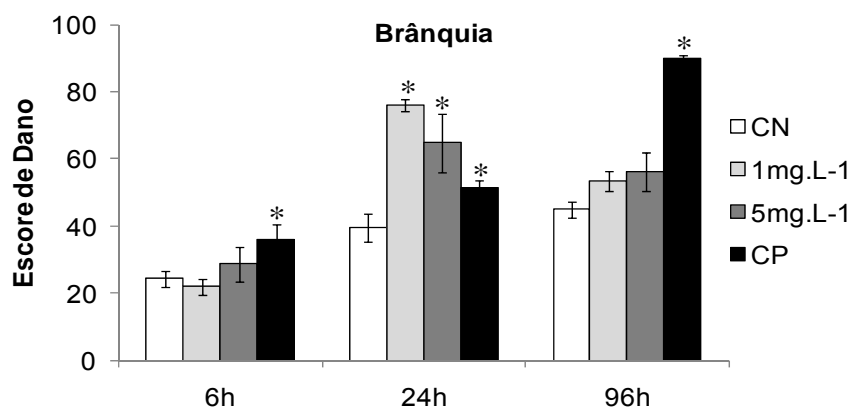


Figura 2 – Escores de dano em células branquiais de *P. lineatus*, expostos apenas à água (CN) ou ao RT (1 mg.L^{-1} e 5 mg.L^{-1}) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Frequência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados (média ± EP) em células branquiais de *P. lineatus* expostos apenas à água (CN) ou ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos (%)				Total de nucleóides danificados (média ± EP)	
			N	0	1	2		3
Brânquia	6h	CN	6	75,7	24,3	0,0	0,0	24,3 ± 2,3
		1 mg.L ⁻¹	6	78,0	22,0	0,0	0,0	22,0 ± 3,4
		5 mg.L ⁻¹	6	74,7	25,2	0,0	0,0	25,2 ± 5,2
		CP	4	70,2	29,8	0,0	0,0	36,0 ± 3,4*
	24h	CN	6	60,7	39,2	0,2	0,0	39,3 ± 4,3
		1 mg.L ⁻¹	6	21,9	75,0	0,5	0,0	75,5 ± 1,9*
		5 mg.L ⁻¹	5	42,0	57,5	0,5	0,0	70,8 ± 7,2*
		CP	6	49,2	50,2	0,7	0,0	50,8 ± 2,1*
	96h	CN	6	55,0	45,0	0,0	0,0	45,0 ± 2,4
		1 mg.L ⁻¹	6	45,0	53,2	0,2	0,0	53,3 ± 3,1
		5 mg.L ⁻¹	6	43,8	55,3	0,3	0,0	56,7 ± 5,9
		CP	4	10,4	89,4	0,2	0,0	89,6 ± 1,0*

Os valores representam a média ± EP. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,01).

As análises do número de nucleóides danificados nas brânquias dos peixes expostos às duas concentrações de RT, por 6 h, não mostraram diferença significativa em relação aos grupos CN. Já após 24 h de exposição a 1 e 5 mg.L⁻¹ de RT o número de nucleóides danificados foi significativamente maior que os apresentados para seu respectivo grupo CN. O CP apresentou aumento significativo de nucleóides danificados em relação ao CN nos três tempos experimentais (Tabela 2).

Os valores de escore de danos no DNA das células sanguíneas dos animais expostos às duas concentrações de glifosato foram significativamente maiores quando comparadas ao CN, tanto após 6 h, quanto após 96 h de exposição. Em 24 h não foi verificado este aumento (Figura 3). Os eritrócitos dos peixes do grupo CP apresentaram escores de danos

significativamente maiores que do grupo CN, em todos os tempos experimentais (Figura 3).

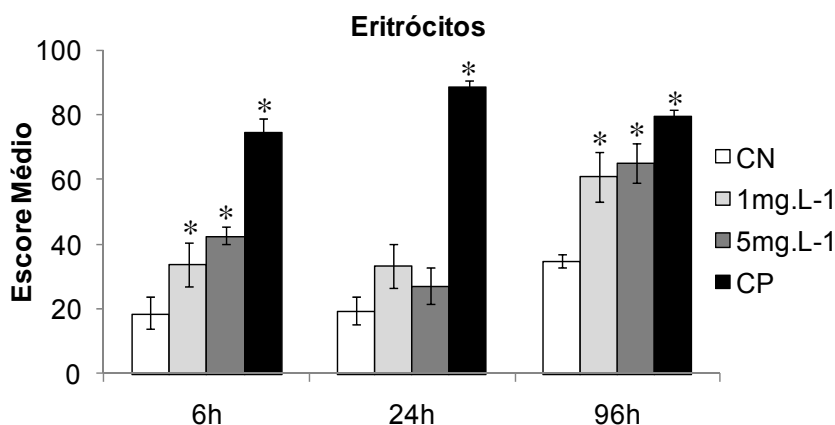


Figura 3 – Escores de dano nos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à água (CN) ou ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN ($p < 0,01$).

Em relação ao número de nucleóides danificados nos eritrócitos, apenas a maior concentração (5 mg.L⁻¹) de glifosato apresentou aumento significativo em relação ao CN, no tempo de 6 h, por outro lado, em 96 h essa diferença foi encontrada em ambas as concentrações (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹). Ainda em 6 h o CN apresentou danos significativamente menores que os encontrados no CP. No tempo de 24 h, o CP mostrou aumento significativo de nucleóides danificados quando comparado ao CN. E após 96 h de exposição as duas concentrações de glifosato e o CP obtiveram danos significativamente maiores em relação ao CN (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados nos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CN) ou ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos (%)				Total de nucleóides danificados (média ± EP)	
			N	0	1	2		3
Eritrócitos	6h	CN	6	83,0	15,2	1,8	0,0	16,7 ± 4,6
		1 mg.L ⁻¹	4	72,0	22,3	5,5	0,2	28,0 ± 3,2
		5 mg.L ⁻¹	6	70,0	19,0	10,0	1,0	31,0 ± 2,4*
		CP	4	26,2	72,7	1,0	0,0	73,7 ± 3,7*
	24h	CN	4	81,0	16,0	2,0	0,0	18,0 ± 4,0
		1 mg.L ⁻¹	6	67,0	33,0	1,3	0,0	33,0 ± 7,0
		5 mg.L ⁻¹	6	77,0	20,0	4,0	0,0	23,4 ± 4,1
		CP	6	13,5	87,8	0,3	0,0	88,2 ± 1,9*
	96h	CN	4	55,0	41,6	3,4	0,0	35,0 ± 2,0
		1 mg.L ⁻¹	4	39,7	59,8	0,5	0,0	60,3 ± 7,2*
		5 mg.L ⁻¹	6	36,0	62,8	1,2	0,0	64,0 ± 5,3*
		CP	5	21,5	76,7	0,0	0,0	78,0 ± 1,7*

Os valores representam a média ± EP. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,01).

Os resultados do ensaio do cometa com os eritrócitos do *P. lineatus*, após 6 h de exposição ao RT, não revelaram diferença significativa dos grupos experimentais em relação ao CN. No tempo experimental de 24 h, foi encontrado valores de escore médio de danos 2 e 3 vezes maiores em relação ao CN, para as concentrações de 1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹, respectivamente. Em 96 h de exposição, os valores de escore médio de danos das duas concentrações de RT estudadas continuaram significativamente diferentes do CN (Figura 4). Como podemos observar na Figura 4, o CP apresentou valores de escore significativamente maiores que seus respectivos CN após os três tempos experimentais.

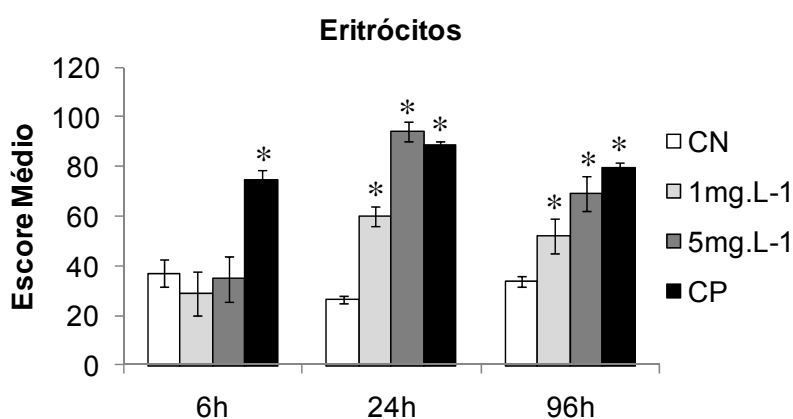


Figura 4 – Escores de dano dos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à água (CN) ou ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

Tabela 4 – Frequência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados nos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CN) ou ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos (%)				Total de nucleóides danificados (média ± EP)	
			N	0	1	2		3
Eritrócitos	6h	CN	6	63,0	37,0	0,0	0,0	37,0 ± 5,5
		1 mg.L ⁻¹	4	71,0	29,0	0,0	0,0	29,0 ± 2,4
		5 mg.L ⁻¹	6	65,3	34,7	0,0	0,0	43,7 ± 8,9
		CP	4	26,2	72,7	0,0	0,0	73,7 ± 3,7*
	24h	CN	4	73,3	26,7	0,0	0,0	26,7 ± 1,5
		1 mg.L ⁻¹	6	41,3	57,2	1,3	0,0	59,8 ± 7,5*
		5 mg.L ⁻¹	6	12,5	80,8	6,6	0,0	87,5 ± 1,4*
		CP	6	13,5	87,8	0,3	0,0	88,2 ± 1,9*
	96h	CN	4	66,3	33,7	0,0	0,0	33,7 ± 2,0
		1 mg.L ⁻¹	4	47,8	52,2	1,6	0,3	52,2 ± 3,3*
		5 mg.L ⁻¹	6	30,7	67,2	1,0	0,0	68,2 ± 6,2*
		CP	5	21,5	76,7	0,0	0,0	78,0 ± 1,7*

Os valores representam a média ± EP. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

Os resultados do número de nucleóides danificados nos eritrócitos esta espécie de peixe, são iguais aos resultados obtidos para o escore médio de danos. Pois, na exposição de 6 h houve aumento significativo de nucleóides danificados apenas no CP quando comparado ao CN. Em 24 h, a quantidade de nucleóides danificados na concentração de 5 mg.L⁻¹ foram cerca de 3 vezes maior que os encontrados no CN. Neste mesmo tempo experimental, o CP apresentou valores de nucleóides danificados maiores que os encontrados no CN. Os resultados após 96 h de exposição revelaram aumento significativo de nucleóides danificados nos dois tratamentos, 1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹, e no CP em relação ao CN (Tabela 4).

3.2 OCORRÊNCIA DE MICRONÚCLEO E OUTRAS ALTERAÇÕES ERITROCÍTICAS NUCLEARES

Como mostra a Tabela 5, as análises de teste do MN para os peixes expostos ao glifosato, não revelaram diferença significativa para a presença de células micronucleadas em nenhum dos três tempos experimentais (6, 24 e 96 h), em nenhuma das duas concentrações testadas do produto (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹), bem como no CP quando comparado os respectivos CN.

Tabela 5 – Frequência média de ocorrência, para cada 1000 eritrócitos analisados, de micronúcleos nos peixes dos grupos CN ou expostos a 1 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ de glifosato após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h.

Alteração	Tempo	Grupo	N	Número Total de Eritrócitos com MN	Frequência média de ocorrência (%)
Micronúcleo	6 h	CN	6	0	0,0 ± 0,0
		1 mg.L ⁻¹	4	3	0,3 ± 0,3
		5 mg.L ⁻¹	5	0	0,0 ± 0,0
		CP	6	0	0,0 ± 0,0
	24 h	CN	6	1	0,1 ± 0,1
		1 mg.L ⁻¹	6	1	0,1 ± 0,1
		5 mg.L ⁻¹	6	1	0,1 ± 0,1
		CP	6	2	0,1 ± 0,1
	96 h	CN	4	0	0,0 ± 0,0
		1 mg.L ⁻¹	6	0	0,0 ± 0,0
		5 mg.L ⁻¹	5	1	0,1 ± 0,1
		CP	6	0	0,0 ± 0,0

N = número de animais analisados. Os resultados representam o valor da média ± erro padrão (P < 0,05).

Assim como nas análises do teste do MN, as análises das três classes de AEN (rim, segmentado e lobulado) não mostraram diferença significativa das concentrações de 1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹ em relação ao CN, em nenhum dos três tempos experimentais realizados. Foi encontrado aumento significativo no número de AEN no CP em relação ao CN nos tempos de 24 e 96 h (Figura 5).

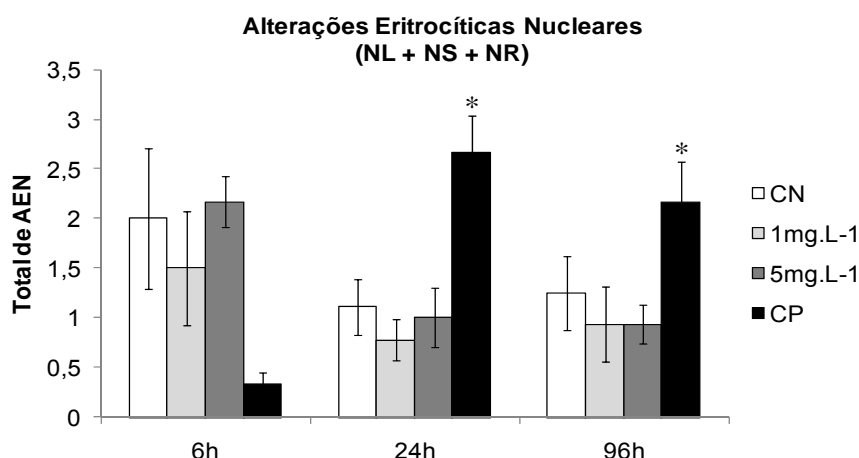


Figura 5 – Frequência média de ocorrência de AEN (núcleo lobulado (NL), núcleo segmentado (NS) e núcleo em forma de rim (NR)), para cada 1000 eritrócitos analisados, nos peixes dos grupos CN, 1 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ e CP, após 6, 24 e 96 h de exposição ao glifosato. N = número de animais analisados. Os resultados representam o valor da média ± erro padrão (P < 0,05).

Tabela 6 – Frequência média de ocorrência, para cada 1000 eritrócitos analisados, de micronúcleos nos peixes dos grupos CN ou expostos a 1 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ de RT após 6, 24 e 96 h. O controle positivo (CP) representa animais injetados com ciclofosfamida e amostrados, após 6, 24 e 96 h.

Alteração	Tempo	Grupo	N	Número Total de Eritrócitos com MN	Frequência média de ocorrência (%)
Micronúcleo	6 h	CN	6	0	0,0 ± 0,0
		1 mg.L ⁻¹	4	0	0,0 ± 0,0
		5 mg.L ⁻¹	5	0	0,0 ± 0,0
		CP	6	0	0,0 ± 0,0
	24 h	CN	6	0	0,0 ± 0,0
		1 mg.L ⁻¹	6	0	0,0 ± 0,0
		5 mg.L ⁻¹	6	0	0,0 ± 0,0
		CP	6	2	0,1 ± 0,1
	96 h	CN	4	0	0,0 ± 0,0
		1 mg.L ⁻¹	6	0	0,0 ± 0,0
		5 mg.L ⁻¹	5	0	0,0 ± 0,0
		CP	6	0	0,0 ± 0,0

N = número de animais analisados. Os resultados representam o valor da média ± erro padrão (P < 0,05).

As análises de ocorrência de MN nos eritrócitos de *P. lineatus*, após exposição ao RT, nos tempos de 6, 24 e 96 h, mostraram a incidência de apenas duas células micronucleadas no CP, após 24 h exposição, mostrando que não houve, então, diferença significativa da ocorrência de MN em nenhuma das concentrações testadas, nem no CN, nem no CP em nenhum dos tempos de exposição (Tabela 6).

Pode-se verificar através da Figura 6 que a soma das freqüências totais dos três tipos de AEN (constricção, segmentada e lobulada) só apresentou valores significativamente maiores no CP, em 24 e 96 h de exposição, em relação ao grupo CN. O mesmo não foi encontrado em 6 h de exposição.

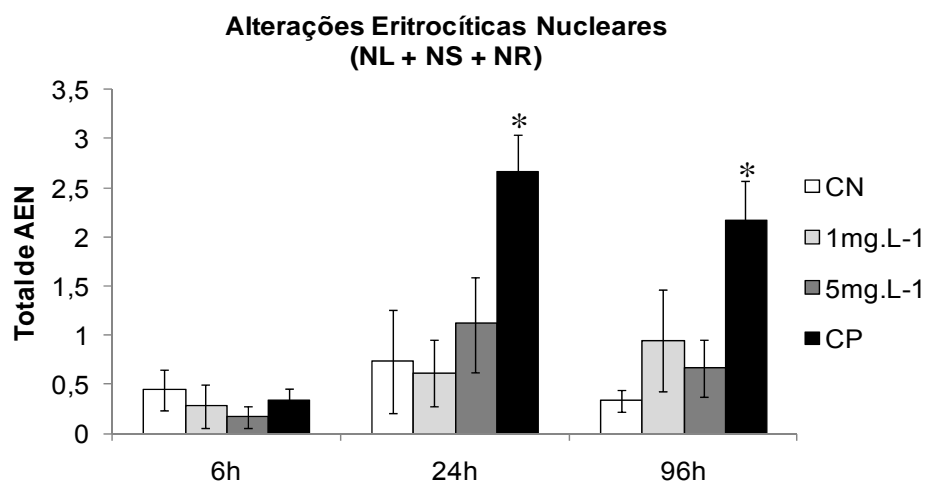


Figura 6 – Freqüência média de ocorrência de AEN (núcleo lobulado (NL), núcleo segmentado (NS) e núcleo em forma de rim (NR)), para cada 1000 eritrócitos analisados, nos peixes dos grupos CN, 1 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹ e CP, após 6, 24 e 96 h de exposição ao RT. N = número de animais analisados. Os resultados representam o valor da média ± erro padrão (P < 0,05).

4 DISCUSSÃO

Para constituir o grupo CP em experimentos de genotoxicidade deve ser escolhida uma substância conhecida por produzir danos no DNA quando administradas em níveis que se espera detectar estes danos [45]. Neste trabalho

a ciclofosfamida foi utilizada como controle positivo por tratar-se de um composto que quando metabolizado nas células pode produzir mutações, aberrações cromossômicas e micronúcleos em uma variedade de células [46]. A ciclofosfamida sendo um agente reconhecidamente mutagênico e pode ser utilizados em experimentos toxicológicos a fim de se ter controle sobre a técnica utilizada. Como pudemos observar nos resultados do ensaio do cometa, tanto com os eritrócitos quanto com as células branquiais, a ciclofosfamida promoveu danos ao DNA superiores aos encontrados no CN, confirmando assim seu potencial genotóxico e atestando a sensibilidade de nosso modelo biológico e de nosso ensaio. Outros estudos também já fizeram uso da ciclofosfamida e observaram seu potencial tóxico [32, 36].

Por outro lado, a ciclofosfamida não promoveu efeito mutagênico na molécula de DNA dos eritrócitos de *P. lineatus*, pois não foi encontrado MN em quantidades significativas, embora outros trabalhos já tenham reportado a ciclofosfamida como indutor de MN em outras espécies de peixes [35, 47, 48], inclusive em *P. lineatus* [29, 32]. Winter *et al.* [49] desenvolveram um trabalho no qual também não verificaram a ocorrência de MN em peixes da espécie *Pimephales promelas*, em exposições de 96 h, aplicando injeção intraperitoneal de ciclofosfamida de 50 a 400 mg.Kg⁻¹, sendo que a menor concentração utilizada foi semelhante a deste trabalho. Os resultados obtidos por estes autores se assemelham com os do presente trabalho, pois também não encontraram indução significativa de MN nos eritrócitos desses peixes. Estes autores comentam que não existe uma razão bem definida para essa baixa indução de MN após tratamento com ciclofosfamida, o que eles propõem é que como a ciclofosfamida necessita da ativação metabólica para induzir danos genéticos, qualquer redução na capacidade metabólica destes organismos poderia comprometer a metabolização deste composto. Entretanto esta hipótese não se aplica no presente trabalho, considerando-se que a ciclofosfamida foi capaz de gerar danos no DNA que foram detectados pelo ensaio do cometa. Talvez o fato de não ter havido indução de MN seja devido ao curto tempo de exposição dos animais à ciclofosfamida, ou ainda, devido a diferença de sensibilidade entre o ensaio do

cometa e o teste do micronúcleo, uma vez que a maneira com que os danos ao DNA ocorrem não é a mesma para genotoxicidade e mutagenicidade.

O ensaio utilizado neste trabalho para avaliar a genotoxicidade do glifosato e do RT foi o ensaio do cometa, por tratar-se de uma metodologia capaz de detectar danos diretos [27] ou indiretos [30] na molécula de DNA em células individuais, bem como, reparo em caso de fragmentação [50]. No que se refere à utilização de peixes para ensaios de toxicidade, o uso de eritrócitos para avaliar danos no DNA através do ensaio do cometa parece ser vantajoso devido a facilidade de coleta deste material [51], e pelo fato destas células estarem entre as primeiras a sofrer efeitos tóxicos [52].

Os resultados do ensaio do cometa com os eritrócitos de *P. lineatus*, expostos ao glifosato, mostraram danos na molécula de DNA após 6 horas de exposição, nas duas concentrações testadas; já após 24 horas esses danos retornaram ao nível basal e após 96 horas as lesões no DNA voltaram a ser encontradas. O fato de não haver danos após 24 horas de exposição pode ser devido à atividade do sistema de reparo do DNA, atuando para reparar as quebras ocasionadas pela exposição ao glifosato, o que não foi mais possível após 96 h, quando os danos na molécula de DNA voltaram a aparecer.

Guilherme *et al.* [53] utilizando peixes da espécie *Anguilla anguilla*, expostos a 0,018 e 0,036 mg.L⁻¹ de glifosato, por 24 e 72 h, encontraram aumento significativo de danos no DNA dos eritrócitos nas duas concentrações testadas. A presença destes danos após 24 h de exposição difere da resposta encontrada neste trabalho. Essa diferença pode ser devido à maior sensibilidade da espécie utilizada por esses autores, apesar de terem utilizado indivíduos maiores que os do presente trabalho, ou ainda pelo sistema de reparo nesta espécie não ter atuado de forma que pudesse reparar os danos frente à exposição ao glifosato. Por outro lado, Cavalcante *et al.* [32] testaram a concentração de 10 mg.L⁻¹ do Roundup® Original, que também possui como princípio ativo o glifosato, em *P. lineatus*, e obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho. Os resultados obtidos por estes autores, em comparação com os resultados deste trabalho, indicam que os peixes da espécie *P. lineatus*

responderam ao glifosato da mesma maneira que ao produto formulado, apesar de ter sido testado em concentrações menores.

Os eritrócitos dos peixes expostos ao RT apresentaram aumento de danos na molécula de DNA após 24 e 96 h de exposição. Uma possível explicação para as lesões genômicas nos eritrócitos perdurarem até 24 e 96 h seria que a quantidade de danos no DNA destas células deve ter sido maior que a capacidade das enzimas do sistema de reparo de atuar no reparo desses danos. Çavas e Konen [36] utilizando o peixinho dourado (*Carassius auratus*) expostos a 5 mg.L⁻¹ de Roundup® Original por 48 e 96 h, também encontraram danos no DNA que persistiram ao longo do tempo. Estes resultados mostram que tanto o RT quanto o Roundup® Original, dois produtos formulados a base de glifosato, são genotóxicos, nessas condições, para estas duas espécies de peixes.

Comparando-se as análises de fragmentação da molécula de DNA nos eritrócitos dos peixes expostos ao glifosato e ao RT, podemos constatar que ambos exerceram efeito genotóxico. Estes resultados contrariam algumas informações encontradas na literatura que relatam o princípio ativo como sendo menos tóxico que o produto formulado. Concluímos então, que o princípio ativo pode estar contribuindo na genotoxicidade do produto formulado.

Além dos eritrócitos, outros tipos de células podem ser empregadas para verificar danos na molécula de DNA através do ensaio do cometa, entre essas células estão as branquiais [31]. As células das brânquias vêm sendo bastante utilizadas devido ao fato deste órgão estar em contato direto com os contaminantes presentes na água. A avaliação dos danos no DNA destas células mostrou que o glifosato foi genotóxico apenas após 6 h de exposição à maior concentração testada, já o RT foi genotóxico após 24 h de exposição, nas duas concentrações testadas. Esses resultados mostram que tanto o glifosato como o RT tem pouco efeito sobre este tecido, ou ainda que o sistema de reparo esteja atuando de forma eficiente, não permitindo que danos fossem encontrados nos demais tempos experimentais. No trabalho de Cavalcante *et al.* [32], foram encontradas lesões no DNA de células branquiais de *P. lineatus* tanto em 6 quanto 24 h de exposição, mostrando que para este tecido o Roundup® Original

exerceu efeito genotóxico por um tempo mais prolongado quando comparado do glifosato e ao RT.

Os resultados deste trabalho mostraram que tanto o glifosato quanto o RT não induzem a ocorrência de MN nos eritrócitos de *P. lineatus*, tão pouco a presença de AEN significativamente maiores que o CN. Resultados semelhantes foram encontrados por Guilherme *et al.* (2010), que também não verificaram a ocorrência de MN e AEN em *A. anguilla*, após 24 h de exposição ao glifosato. Grisolia [35] comenta que estudos utilizando agroquímicos estão mostrando a existência de diferenças entre os princípios ativos e suas formulações com relação à mutagenicidade, e ainda que o aumento da toxicidade do produto formulado se deve aos surfactantes ou compostos inertes, os quais se mostram muitas vezes mais tóxicos do que mutagênicos. No presente trabalho não foi encontrado aumento significativo para a ocorrência de MN e/ou AEN, nas exposições ao glifosato e ao RT, no entanto, tanto o princípio ativo quanto o produto formulado exerceram efeitos genotóxicos sobre a molécula de DNA detectados pelo ensaio do cometa, nos eritrócitos e nas células branquiais de *P. lineatus* corroborando, assim, com as constatações que relatam esses compostos como sendo genotóxicos e não mutagênicos.

Em conclusão, nossos resultados indicaram que tanto o glifosato quanto o RT causam danos à molécula de DNA de *P. lineatus*, mostrando que o princípio ativo pode estar colaborando para a genotoxicidade do produto formulado, porém ambos agem com mais intensidade nos eritrócitos do que nas células branquiais. Provavelmente como as brânquias estão em contato direto e constante com os contaminantes presentes na água apresentam mais defesas do que outros tecidos. Demonstraram também que o ensaio do cometa foi uma técnica eficiente para detectar danos no DNA desta espécie de peixe frente à exposição a estes compostos. Por outro lado, o glifosato e o RT, nesses mesmos testes, não exerceram efeito mutagênico no DNA dos eritrócitos, o que não invalida o teste do micronúcleo e a análise das AEN como boas ferramentas para este tipo de estudo, uma vez que outros autores encontraram respostas positivas utilizando estes testes.

AGRADECIMENTOS.

Os autores agradecem a Estação de Piscicultura da UEL pelo fornecimento dos peixes, a CAPES pela bolsa de mestrado concedida a N.C. Moreno e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL pelo apoio concedido. C.B.R. Martinez é bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] I. K. Konstantinou, D. G. Hela, T. A. Albanis, The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels, *Environ. Pollut.* 141 (2006) 555-570.
- [2] G. M. Williams, R. Kroes, I. C. Munro, Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans, *Regul. Toxicol. Pharm.* 31 (2000) 117-165.
- [3] K. R. Solomon, D. G. Thompson, Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate, *J. Toxicol. Env Health. Part B – 6* (2003) 289–324.
- [4] T. Yamada, P. R. C. Castro, P. R. C., Efeito do Glifosato nas plantas: Implicações Fisiológicas e Agronômicas. International Plant Nutrition Institute. Informações Agronômicas. Nº 199 (2007).
- [5] B. N. Rodrigues, F. S. Almeida, Guia de Herbicidas - 5ª Edição, pp 275-289. Londrina, 2005.
- [6] O. P. JR. Amarante, T. C. R. Santos, N. M. Brito, M. L. Ribeiro, Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação, *Química Nova.* 25 (2002) 589–593.
- [7] C. F. B. Coutinho, S. T. Tanimoto, A. Galli, G. S. Garbellini, M. Takayama, R. B. Amaral, H. Luiz Mazo, L. A. Avaca, S. A. S. Machado, Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez, *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 15 (2005) 65-72.
- [8] PIONNER. <http://www.pioneersementes.com.br/ProdutosBiotecnologiaSojaRR.a.spx>. Disponível em 7 de julho de 2010.
- [9] BULA DO ROUNDUP TRANSORB. <http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/fichas-de-emergencia-e-bulas/pdf/roundup-transorb-bula.pdf>. Disponível em 14 de julho de 2010.
- [10] C. M. Howe, M. Berrill, D. B. Pauli, C. C. Helbing, K. Werr, N. Veldhoen, Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species, *Environ Toxicol Chem.* 23 (2004) 1928–1938.
- [11] WHO. Glyphosate. Environmental Health Criteria No. 159. World Health Organization, Geneva. 1994

- [12] F. Peixoto, Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation, *Chemosphere* 61 (2005) 1115-1122.
- [13] M.T.K. Tsui, L. M. Chu, Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors, *Chemosphere* 52 (2003) 1189–1197.
- [14] V.C. Langiano, C.B.R. Martinez, Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Comparative Biochem Physiol. Part C* 147 (2008) 222–231.
- [15] FISPQ. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Roundup Transorb®. Revisão 2. 12/05/2008.
- [16] M.H. Inoue, JR. Oliveira, J. B. Reginato, C. A. Tormena, V. L. Tornisiolo, J. Constantin, Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná, *Planta Daninha* 21 (2003) 313-323.
- [17] D.R. Nimmo, Pesticides. In: Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. (eds.) *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. New York: Hemisphere, 1985, pp. 335-373.
- [18] J. D. Simonato, C. L. B. Guedes, C. R. B. Martinez, Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil, *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 69 (2008) 112–120.
- [19] J. Cazenave, C. Bacchetta, M. J. Parma, P. A. Scarabotti, D. A. Wunderlin, Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ. Pollut.* 157 (2009) 3025–3033.
- [20] C. B. R. Martinez, I. M. S. Cólus, Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Medri, M.E et al. (eds). *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: Edição dos editores, 2002, pp. 551-577.
- [21] M. F. Simoniello, F. Gigena, G. Poletta, A. Loteste, E. Kleinsorce, M. Campana, J. Scagnetti, M. J. Parma, Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae), *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 83 (2009) 155–158.
- [22] T. B. Jesus, C. E. V. Carvalho, Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg), *Ecologia Brasileira* 12 (2008) 680-693.

- [23] G. Frenzili, V. Scarcelli, I. Barga, M. Nigro, L. Forlin, C. Bolognesi, J. Sturve, DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbor, *Mutat. Res.* 552 (2004) 187-195.
- [24] J. I. R. Porto, C. S. O. Araújo, E. Felberg, Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species, *Environ. Res.* 97 (2005) 287–292.
- [25] T. Ohe, T. Watanabe, K. Wakabayashi, Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.* 567 (2004) 109–149.
- [26] V. L. S. S. Castro, Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos no desenvolvimento animal, *Cadernos de Ciência e Tecnologia* 21 (2004) 469-497.
- [27] C. Paz-y-Minõ, M. V. Dávalos, M. E. Sánchez, M. Arévalo, P. E. Leone, Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay, *Mutat. Res.* 516 (2002) 57 –61.
- [28] F. E. Matsumoto, I. M. S. Cólus, Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate, *Genet. Mol. Biol.* 23 (2000) 489-492.
- [29] 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.
- [30] A. N. Jha, Ecotoxicological applications and significance of the comet assay, *Review Mutagenesis.* 23 (2008) 207–221.
- [31] 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.
- [32] D. G. S. M. Cavalcante, C. R. B. Martinez, S. H. Sofia, Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*, *Mutat. Res.* 655 (2008) 41–46.
- [33] I. Udriou, The micronucleus test in piscine erythrocytes, *Aquat. Toxicol.* 79, (2006) 201–204.
- [34] K. Al-Sabti, C. D. Metcalfe, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat. Res.* 343 (1995) 121-135.

- [35] C. K. Grisolia, A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides, *Mutat. Res.* 518 (2002) 145–150.
- [36] T. Çavas, S. Konen, Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, *Mutagenesis* 22 (2007) 263–268.
- [37] B. C. Ventura, D. F. Angelis, M. A. Marin-Morales, Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic. Biochem. Phys.* 90 (2008) 42-51.
- [38] S. Ergene, T. Çavas, A. Celik, N. Koleli, F. Kaya, A. Karahan, Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution, *Ecotoxicology* 16 (2007) 385–391.
- [39] S. N. Talapatra, S. K. Banerjee, Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 210–215.
- [40] 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.
- [41] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider, A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [42] H. Kobayashi, C. Suguyama, Y. Morikawa, M. Hayashi, T. A. Sofuni, A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis, *MMS. Commun.* 3 (1995) 103–115.
- [43] R. N. Hooftman, W. K. De Raat, Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate, *Mutat. Res.* 104 (1982) 147-152.
- [44] K. R. Carrasco, K. L. Tilbury, M. S. Myers, Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47 (1990) 2123-2436.

- [45] 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/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.
- [46] D. Anderson, J. B. Bishop, R. C. 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.
- [47] F. Ayllon, 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.
- [48] J. V. Candiotti, S. Soloneski, M. L. Larramendy, Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae), *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 703 (2010) 180-186.
- [49] M. J. Winter, L. C. J. Ellis, T. H. Hutchinson, T. H. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide, *Mutat. Res.* 629 (2007) 89–99.
- [50] R. J. Preston, Genetic Toxicology. In: R. C. Smart, E. Hodgson, Molecular and Biochemical Toxicology. 4a. Ed. Editora Wiley. (2001) 587-606.
- [51] S. Sharma, N. S. Nagpude, 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. Con. Tox.* 53 (2007) 617–623.
- [52] C. Ruas, C. Carvalho, H. De Araújo, E. Espíndola, M. Fernandes, Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river, *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 71, (2008) 86–93.
- [53] S. Guilherme, I. Gaivão, M. A. Santos, M. Pacheco, European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup—a glyphosate-based herbicide, *Mutagenesis.* 25 (2010) 523–530.

5 ARTIGO B: ENSAIOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO GLIFOSATO E DO ROUNDUP TRANSORB® EM ERITRÓCITOS DO PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS*

Natália Cestari Moreno¹, Sílvia Helena Sofia¹, Claudia B. R. Martinez^{2*}

¹*Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina*

²*Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina*

Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 – Km 380 – Campus Universitário

Cx. Postal – 6001 CEP – 86051-990

Londrina – PR – Brasil

Telefone: 55-43-3371-4437

E-mail: cbueno@uel.br

* Autor para Correspondência

Artigo a ser submetido ao periódico *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

Resumo

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar se o herbicida glifosato e seu produto formulado Roundup Transorb (RT) promovem danos na molécula de DNA de eritrócitos do peixe *Prochilodus lineatus*, utilizando-se o ensaio do cometa e o ensaio de difusão do DNA. Para verificar a origem dos possíveis danos foi utilizado um ensaio que detecta a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante total (CAO) e para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos foi empregado o tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN). Para tanto, foram utilizados eritrócitos de juvenis de *P. lineatus* expostos *in vitro*, durante 1, 3 e 6 h a 1 e 5 mg.L⁻¹ de glifosato e RT ou à PBS (CN). Os resultados do ensaio do cometa revelaram danos no DNA na exposição a 1 mg.L⁻¹ glifosato após 1 h e ao RT nos três tempos experimentais a 1 e 5 mg.L⁻¹, em relação ao CN. O ensaio que detecta a produção de ERO mostrou aumento de ERO e da CAO após 1 h à 1mg.L⁻¹ de glifosato e aumento de ERO e diminuição da CAO após 1 h à 5mg.L⁻¹ de RT, comparado ao CN. As análises não mostraram aumento de apoptose e/ou necrose nos grupos expostos do glifosato e ao RT em relação ao CN. E o TRVN mostrou diminuição da estabilidade dos lisossomos, comparado ao CN, expostos ao glifosato a 5 mg.L⁻¹ após 3 e 6 h e ao RT a partir de 1 h. Esses resultados mostraram que em sistemas *in vitro* o RT exerceu efeito genotóxico sobre a molécula de DNA dos eritrócitos de *P. lineatus*, sendo que o mesmo não foi observado para as exposições ao glifosato e que essas lesões podem ter sido geradas, em parte, pelas enzimas liberadas da desestabilização da membrana dos lisossomos.

Palavras-chave: Apoptose. Capacidade antioxidante. Danos oxidativos. Ensaio do cometa. Espécies reativas de oxigênio. Integridade lisossômica.

1 INTRODUÇÃO

Os herbicidas à base de glifosato são os mais amplamente utilizados no mundo, devido à sua grande eficiência no controle das plantas invasoras [1], além de serem também muito utilizados nos ambientes aquáticos para o controle de macrófitas [2], sendo assim seus resíduos são poluentes encontrados com frequência no ambiente [3]. Existem mais de 90 marcas comerciais de glifosato no mundo [4] e sua fórmula molecular C₃H₈NO₅P apresenta três grupos funcionais: amina, carboxil e fosfato [5]. Em condições ambientais o glifosato é muito solúvel em água e quase insolúvel em solventes orgânicos comuns [6], tais como acetona, etanol, entre outros.

O glifosato é absorvido pelo tecido vivo e translocado para raízes e rizomas, inibindo a ação da enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintase (EPSP). A inibição da EPSP interrompe a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais e as plantas tratadas com este herbicida morrem em poucos dias ou semanas [7, 8].

Segundo a Organização Mundial da Saúde a LD₅₀ de glifosato para ratos é de 4.230 mg.Kg⁻¹, enquanto que o fabricante (Monsanto) cita uma LD₅₀ de 5.600 mg.kg⁻¹ [7]. Um estudo desenvolvido por Giesy [9], com a truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss*, mostrou que a CL₅₀ do glifosato está entre 140 a 240 mg.L⁻¹, dependendo do tempo de exposição. Entretanto, em ambientes aquáticos a toxicidade do glifosato pode ser acentuada com o aumento da temperatura e do pH [7].

A formulação de glifosato mais utilizada para o controle de plantas invasoras é o Roundup® e seus produtos formulados [3], dentre os quais podemos destacar o Roundup Transorb® (RT). Assim como o glifosato, o RT é um herbicida de amplo espectro e não seletivo, podendo ser utilizado na agricultura, horticultura e áreas aquáticas para o controle de plantas invasoras em geral [10]. O RT foi desenvolvido para ser aplicado em períodos de chuva, pois é absorvido pela planta em apenas uma hora após a aplicação, enquanto o Roundup® precisa de pelo menos quatro horas para ser absorvido em quantidades suficientes.

O RT vem sendo comercializado desde 1998 e é formulado com glifosato e ingredientes inertes [10]. O surfactante desta fórmula não é divulgado pelo fabricante, o que se conhece da fórmula é que possui uma mistura de surfactantes contendo 15% de polietoxileno amina (POEA) e outras substâncias não divulgadas [11], recebendo esta mistura o nome de Transorb. O consumo de RT vem aumentando devido sua eficiência no combate de plantas invasoras, porém pouco se sabe os efeitos desse herbicida no ambiente aquático e os danos que podem causar para os organismos aquáticos.

Uma forma de se verificar os efeitos desses compostos é através da utilização de organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental. Esta resposta pode acontecer por meio de alterações de funções vitais

ou pela acumulação de agentes tóxicos, e estas respostas podem fornecer informações sobre as condições do ambiente [12]. Além de organismos ou comunidades, células isoladas podem ser utilizadas para esse tipo de avaliação e também podem auxiliar para a compreensão do mecanismo de ação de diversos compostos químicos. Ensaio com células isoladas, em testes *in vitro*, podem oferecer uma resposta rápida, sensível e uma alternativa relativamente barata em comparação aos testes *in vivo* [9]. Além disto, estes testes podem fornecer informações básicas sobre a natureza dos agentes testados e sobre a resposta celular, devido à relativa simplicidade do sistema testado se comparado aos modelos animais mais complexos [13].

A utilização de parâmetros genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos, como forma de avaliar a qualidade da água, permite constatar o efeito dos poluentes no ambiente aquático, como também alterações de seu potencial tóxico ou genotóxico após interação com o ambiente; esse potencial genotóxico pode ser verificado pelo ensaio do cometa [14]. O ensaio do cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) é um dos testes mais populares para a detecção de quebras na fita do DNA em animais aquáticos [15] e em ensaios *in vitro* [16], pois pode avaliar dano e reparo no DNA [17]. É uma técnica capaz de detectar danos diretos [18] e indiretos [19, 20] no DNA em células individuais, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes.

O ensaio de difusão do DNA, para análise da indução de apoptose e necrose [21], pode ser uma ferramenta complementar para verificar se o DNA está sendo reparado ou se as células estão morrendo frente ao contaminante. Compreender como os compostos químicos podem induzir a apoptose ou a necrose em organismos vivos (aquáticos e terrestres) é cada vez mais necessário [22]. A apoptose pode ser induzida por diferentes tipos de agentes estressores, como alguns metais, monóxido de carbono, pesticidas organofosforados, dioxinas, hidrocarbonetos poliaromáticos, radiação [23] e a necrose pode ser induzida por privações de nutrientes, estresse oxidativo, sobrecarga intracelular de Ca^{2+} ou altas concentrações de substâncias tóxicas [24]. Entretanto, ainda são escassos os estudos que utilizam este ensaio para avaliação da qualidade da água utilizando células de peixes como indicadores,

pois a maioria desses estudos tem sido conduzidos utilizando células de mamíferos como modelo experimental.

A técnica do tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN) para avaliar a integridade lisossômica pode fornecer informações adicionais para a compreensão do mecanismo pelo qual compostos tóxicos no ambiente aquático podem causar danos ao DNA [25]. Esta técnica vem sendo empregada para avaliar as alterações à integridade e estabilidade da membrana lisossomal causadas por poluentes ambientais [26]. Inicialmente o ensaio TRVN foi desenvolvido para avaliar a citotoxicidade *in vitro*, baseado no uso de cultura de células de mamíferos. Com a crescente preocupação relacionada com a contaminação aquática, esta metodologia foi adaptada para estudos de ecotoxicidade utilizando-se células de peixes [25].

A avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e da capacidade antioxidante de células e tecidos expostos aos agentes químicos também é de extrema importância na análise dos mecanismos de toxicidade destes compostos [23]. É sabido que o ambiente aquático recebe diariamente quantidades substanciais de poluentes que tem o potencial de causar estresse oxidativo para os organismos através da produção das ERO [27]. Os efeitos das ERO são amplos e dentre eles podemos destacar três mecanismos relevantes envolvidos na injúria celular por estresse oxidativo, que são a modificação oxidativa de proteínas, lesões no DNA e a peroxidação de lipídios de membranas [28]. Sabendo-se que as ERO interagem com o DNA causando lesões, elas podem estar envolvidas em processos como a mutagênese, carcinogênese e na fragmentação da molécula de DNA [29]. Danos ao DNA têm sido observados em muitos tipos de células, desde invertebrados até mamíferos, em resposta a várias formas diferentes de estresse oxidativo [30].

Com base no exposto, este trabalho foi desenvolvido para investigar os mecanismos pelas quais o glifosato e o RT podem interagir com a molécula de DNA e causar danos. E ainda, verificar se a toxicidade do RT é mais elevada em comparação ao seu princípio ativo, o glifosato, como é relatado pela literatura devido o produto formulado receber a adição de surfactantes. Para tanto, foram realizados testes *in vitro* com eritrócitos do peixe *Prochilodus lineatus*

e os efeitos foram avaliados empregando-se o ensaio do cometa, o tempo de retenção de vermelho neutro, o ensaio de difusão do DNA e a quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ACLIMATAÇÃO

Foram utilizados indivíduos juvenis da espécie de peixe *Prochilodus lineatus*, com tamanho entre 7 e 12 cm e peso entre 8,3 e 15 g, fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina. Os peixes foram aclimatados por sete dias em tanques de 300 litros, preenchidos com água desclorada (temperatura: $\approx 24^{\circ}\text{C}$; pH: ≈ 7.5), continuamente aerada, sob foto-período de 12 h /12 h e foram alimentados a cada 48 h, exceto no dia anterior ao início dos testes de toxicidade e durante os mesmos.

2.2 ENSAIOS “IN VITRO”

Para os testes *in vitro* seis exemplares juvenis de *P. lineatus* foram anestesiados para a retirada de 10 μL do sangue da veia caudal. O sangue foi misturado em 990 μL de PBS (NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, NaHCO₃ 3,7 mM, Na₂HPO₄ 8,9 mM, NaH₂PO₄ 2,9 mM), para manter a integridade dos eritrócitos, e a diluição foi transferida para microtubos acondicionados em gelo até a exposição das células.

Os testes *in vitro* foram realizados em microplacas de 24 poços, mantidos em temperatura ambiente, nos tempos experimentais de 1, 3 e 6 horas, utilizando-se as concentrações de 1 e 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Roundup Transorb® (Monsanto). Para o glifosato (Sigma-Aldrich; CAS n° 1071-83-6) também foram utilizadas as mesmas concentrações, levando em consideração a quantidade deste sal na fórmula do Roundup Transorb® (48 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Para o grupo controle

negativo (CN) foram adicionados aos poços 60 μL da diluição com 140 μL de PBS. Para constituir os grupos experimentais, foi adicionado aos 60 μL da diluição 140 μL de glifosato e de RT, diluídos previamente em PBS, nas concentrações de 1 e $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. E para constituir o grupo controle positivo (CP), 60 μL da diluição foram expostos a 140 μL do agente genotóxico metil metano sulfonato (MMS) 9 M, que foi previamente diluído em PBS (10^6). As placas foram cobertas com papel alumínio para evitar o ressecamento das amostras e mantidas no agitador magnético até cada um dos tempos experimentais.

Após cada tempo de exposição o material foi retirado da placa e centrifugado a 56 g por 10 minutos e o pellet foi ressuspensionado em 20 μL de PBS para a realização do ensaio do cometa, ensaio de difusão do DNA, tempo de retenção do vermelho neutro e um volume de 200 μL de PBS foi utilizado para determinar a geração de espécies reativas de oxigênio.

2.3 VIABILIDADE CELULAR

Para a realização do ensaio do cometa e do ensaio de difusão do DNA a viabilidade celular foi avaliada, pelo método de exclusão do corante azul de Trypan (Trypan 1% - 1g de Trypan em 100 mL de PBS). Para tanto, um volume de 10 μL da diluição foi misturado em 50 μL do corante e analisados em câmara de Neubauer espelhada, discriminando-se as células viáveis (incolores) e as células inviáveis (azuis). Os ensaios só foram realizados com amostras apresentando viabilidade de no mínimo 80% (TICE *et al.*, 2000).

2.4 ENSAIO DO COMETA

A metodologia empregada no ensaio do cometa alcalino foi baseado no protocolo de Singh *et al.* [31]. Para os testes com as células sanguíneas 10 μL da suspensão celular foram adicionados em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (100 mg em 20 mL de PBS livre de cálcio e

magnésio) para a confecção das lâminas. O volume total da suspensão foi dividido em duas lâminas de vidro, preparadas previamente com agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL PBS livre de cálcio e magnésio), e codificadas para análise posterior. Após serem cobertas com lamínula, as lâminas foram colocadas em geladeira (4°C) por 30 min, para a completa solidificação da agarose com as células.

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi removida e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 h. Após a lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo solução tampão alcalina (0,3 N NaOH; 1 mM EDTA, pH > 13), onde permaneceram por 30 minutos, dentro de um recipiente escuro contendo gelo. Em seguida, as lâminas foram expostas a eletroforese por 20 min, a 300 mA, a 25V (1Vcm⁻¹). Após a eletroforese, as lâminas foram cobertas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Este passo foi repetido por mais 2 vezes. Após a terceira neutralização, as lâminas foram secas em posição inclinada e fixadas com etanol 100% durante 10 minutos. Depois de fixadas, as lâminas foram armazenadas na temperatura de 4°C, por no máximo 30 dias, até a realização das análises.

Para as análises, as lâminas foram coradas com GelRed (15 µl de GelRed diluído em 45 mL de água destilada e 5 mL de NaCl 1M) e analisadas em microscópio de fluorescência. Foram analisados 100 nucleóides por animal e os danos no DNA foram classificados, de acordo com Kobayashi et al. [32], considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. Para o cálculo do escore de dano, o número de nucleóides em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e calculado pela fórmula: (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD), em que: A, B, C e D correspondem ao número de nucleóides em cada uma das classes. Assim, o escore total para os nucleóides analisados 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 dos nucleóides com danos (classes 1, 2 e 3).

2.5 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA

A metodologia utilizada para o ensaio de difusão do DNA, também conhecido como Teste do halo foi realizada segundo Singh [20], com algumas modificações. O procedimento amostral foi realizado como descrito anteriormente para o ensaio do cometa. Este ensaio segue as mesmas etapas e os mesmos sais utilizados para o ensaio do cometa, exceto pela etapa de eletroforese. Neste caso, como pretende verificar se o composto químico testado causa morte celular por apoptose e/ou necrose, a etapa de eletroforese não se faz necessária.

Para cada animal foram analisados 200 nucleóides por lâmina, verificando a presença de nucleóides normais, apoptóticos ou necróticos. Assim como nos outros ensaios, foi realizada a comparação entre os grupos para estimar a porcentagem de nucleóides apoptóticos e necróticos em relação ao controle a cada tempo experimental.

2.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a determinação da capacidade antioxidante total (CAO) foram medidas através do método proposto por Amado *et al.* [33]. Este ensaio foi realizado conforme explicado anteriormente até a etapa de centrifugação. Depois da etapa de centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 200 μ L de PBS, para dar início a este procedimento.

Uma alíquota de 5 μ L dessa diluição foi utilizada para medir a concentração de proteínas nas células sanguíneas. Essa concentração foi determinada pelo Método de Bradford [34]. Este método se baseia na reação de certas proteínas com o corante Coomassie Blue G-250. Uma curva de calibração

com soro albumina bovino (BSA) foi utilizada como referência. A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, a 595 nm (Libra S32).

Após a medida das proteínas na amostra, foi feito um cálculo para normalizar as amostras para 1 mg de proteína e assim poder montar a microplaca, para verificar a produção de ERO. Na montagem da microplaca foram utilizados 4 poços para cada amostra, em dois deles foram colocados 20 μ L de amostra, 80 μ L de tampão fosfato (0,1M; pH 7,4) e 100 μ L de meio de reação (30 mM HEPES, 200 mM KCl, 1 mM Mg^{2+} ($MgCl_2$)) e nos outros dois 20 μ L de amostra, 80 μ L de 2,2'-azobis (2 meilpropinamida) dihidroclorido (ABAP) (10 mM) e 100 μ L de meio de reação. A partir dessa primeira etapa, a fluorescência das amostras da microplaca foi determinada uma vez, em espectrofluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer), em 488 nm (excitação) e 525 nm (emissão), a 35⁰C. Depois dessa primeira leitura, foram adicionados em todos os poços 8,3 μ L de 2',7' diacetato diclorofluoresceína ($H_2DCF-DA$). Este composto é utilizado neste ensaio como substrato para as ERO, a qual o transforma em um composto fluorescente, o DCF, podendo então detectar as ERO produzidas pela amostra. A leitura da fluorescência emitida pela reação entre as ERO e o $H_2DCF-DA$ foi monitorada durante 30 min, a cada 5 min, no espectrofluorímetro.

A decomposição do ABAP, a 35⁰C, gera radicais peroxil, aumentando assim a produção de ERO da amostra. Portanto a capacidade antioxidante total da amostra foi calculada pela diferença relativa entre a área de ERO com e sem ABAP, sendo que um alto valor de área significa capacidade antioxidante baixa, pois elevados níveis de fluorescência obtidos após a adição de ABAP significa que a amostra possui uma baixa competência para neutralizar os radicais peroxil.

Assim como nos ensaios descritos anteriormente, foi realizada uma comparação entre os grupos para obter a quantidade de ERO produzida e a capacidade antioxidante total da amostra.

2.7 TEMPO DE RETENÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (TRVN)

O TRVN foi empregado como um ensaio de citotoxicidade. O protocolo utilizado foi baseado em Lowe *et al.* [35], com algumas modificações. A realização deste teste foi conduzida como explicado para os ensaios *in vitro*. Após cada tempo experimental (1, 3 e 6 h), 20 μL da suspensão celular (sangue com PBS) foram adicionados à 50 μL da solução de vermelho neutro. A solução estoque do corante foi preparada com 20 mg de vermelho neutro, diluídos em 1ml de DMSO (dimetil sulfóxido) e a solução para o uso no experimento foi preparado diluindo 20 μL da solução estoque em 980 μL de solução PBS (NaCl 126,6mM, KCL 4,8mM, CaCl 1,5mM, NaHCO₃ 3,7mM, Na₂HPO₄ 8,9mM, NaH₂PO₄ 2,9 mM).

Para as análises foram confeccionadas duas lâminas por animal que foram mantidas em câmara escura e úmida por 10 min, para absorção do corante pelas células. As análises foram feitas a cada vinte minutos, até o tempo máximo de 80 min, para verificar a integridade da membrana lisossomal.

Foram realizadas análises comparativas entre os grupos, para avaliar se os lisossomos dos eritrócitos retiveram o corante e por quanto tempo essa retenção ocorreu.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas metodologias descritas acima para os grupos controle negativo, glifosato (1 e 5 mg.L⁻¹), RT (1 e 5 mg.L⁻¹) e controle positivo (quando realizado), em um mesmo tempo de exposição, foram comparados entre si pela análise de variância - critério único (ANOVA), seguida de teste de comparações múltiplas SNK (Student-Newman-Keuls), quando necessário. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 ENSAIO DO COMETA

Os resultados de escore de dano dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos ao glifosato, mostraram que apenas após 1 hora de exposição, à menor concentração foram significativamente maiores quando comparados ao CN (Figura 1). O CP, composto por eritrócitos expostos ao MMS, apresentou aumento significativo do escore médio de danos no DNA dos eritrócitos nos três tempos experimentais, em relação ao CN (Figura 1).

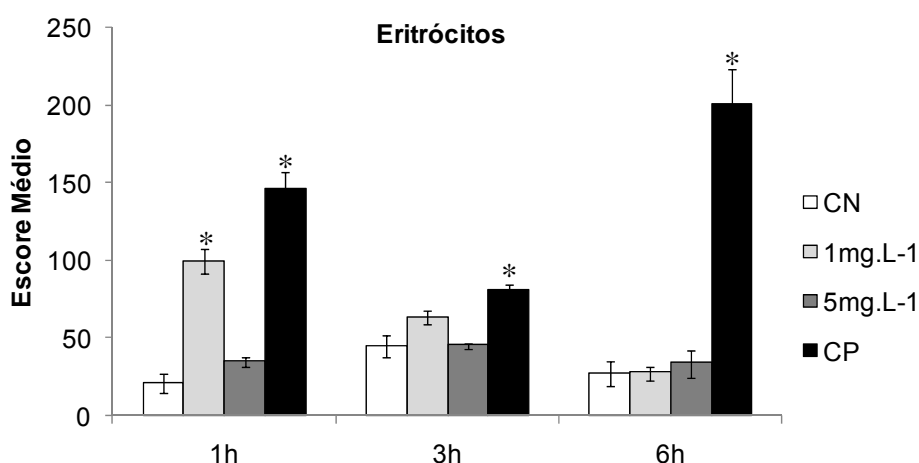


Figura 1 – Escores de dano nos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à PBS (CN), ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,01).

As análises do número de nucleóides danificados seguiram o mesmo padrão de resultados encontrados para escore de danos, pois a menor concentração após 1 h de exposição ao glifosato foi a única que apresentou aumento significativo em relação ao CN, bem como o CP apresentou aumento significativo de nucleóides danificados nos três tempos experimentais (tabela 1).

Tabela 1 – Freqüência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados nos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN), ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h.

Tecido	Tempo	Grupo	Classes de danos (%)				Total de nucleóides danificados (média ± EP)	
			N	0	1	2		3
Eritrócitos	1h	CN	6	80,0	19,0	1,0	0,0	20,0 ± 5,9
		1 mg.L ⁻¹	6	24,2	52,0	23,5	0,2	75,8 ± 4,4*
		5 mg.L ⁻¹	6	54,0	44,0	3,0	0,0	34,0 ± 8,3
		CP	6	23,7	40,7	31,8	4,3	76,8 ± 6,5*
	3h	CN	6	56,0	37,0	4,0	0,0	41,0 ± 7,5
		1 mg.L ⁻¹	6	42,7	55,7	1,7	0,0	63,0 ± 4,9
		5 mg.L ⁻¹	6	60,0	40,0	0,0	0,0	45,0 ± 2,0
		CP	6	24,2	40,8	22,5	12,5	75,0 ± 9,1*
	6h	CN	6	76,0	25,0	1,0	0,0	26,0 ± 7,0
		1 mg.L ⁻¹	6	73,0	27,0	0,0	0,0	27,0 ± 4,0
		5 mg.L ⁻¹	6	67,0	32,0	1,0	0,0	33,0 ± 9,0
		CP	4	4,7	27,0	30,7	37,7	95,3 ± 1,5*

Os valores representam a média ± EP. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,01).

Os resultados de escore médio de danos mostraram que após 1 h de exposição à concentração de 1 mg.L⁻¹ de RT os eritrócitos apresentaram um aumento significativo de danos na molécula de DNA, de cerca de 3 vezes, em relação ao CN. Na maior concentração testada também foram encontrados valores médios de escore quase 4 vezes maiores que os encontrados no CN. Neste mesmo tempo experimental os eritrócitos expostos ao MMS apresentaram valores de escore significativamente maiores que os do CN (Figura 2).

Após 3 h de exposição, também foi encontrado um aumento significativo de escore de danos, de cerca de 3 vezes, na menor concentração de RT em relação ao CN, e um aumento de pouco mais de 2 vezes na maior concentração de RT em relação ao CN. Os eritrócitos do grupo CN também apresentaram escore de danos significativamente menores, em relação ao CP. Na exposição de 6 h, os eritrócitos expostos às duas concentrações de RT e do

grupo CP apresentaram danos significativos cerca de 3 vezes maior que no grupo CN (Figura 2).

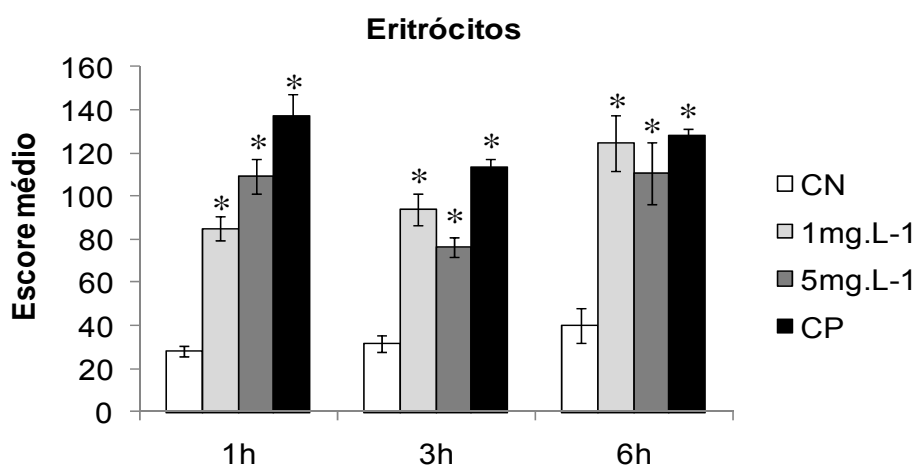


Figura 2 – Escores de dano nos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à PBS (CN), ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 4 a 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,01).

Tabela 2 – Frequência (%) de nucleóides observados em cada uma das classes do Cometa (0, 1, 2 e 3) e do total de nucleóides danificados nos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN), ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) e o MMS (CP) após 1, 3 e 6 h.

Tecido	Tempo	Grupo	N	Classes de danos (%)				Total de nucleóides danificados (média ± EP)
				0	1	2	3	
Eritrócitos	1h	CN	6	72,0	27,8	0,2	0,0	28,0 ± 2,3
		1 mg.L ⁻¹	6	21,4	72,3	6,3	0,0	85,0 ± 5,5*
		5 mg.L ⁻¹	6	18,8	61,2	19,5	0,5	109,2 ± 8,1*
		CP	6	3,3	57,3	38,3	1,0	137,0 ± 10,1*
	3h	CN	6	70,0	28,3	1,7	0,0	31,7 ± 4,0
		1 mg.L ⁻¹	6	13,2	79,7	7,2	0,0	94,0 ± 7,4*
		5 mg.L ⁻¹	6	27,7	61,3	15,7	0,0	76,4 ± 4,3*
		CP	6	2,0	87,8	15,3	0,0	113,3 ± 4,1*
	6h	CN	6	60,0	39,8	0,2	0,0	40,3 ± 8,0
		1 mg.L ⁻¹	6	10,5	63,5	25,5	0,5	124,4 ± 12,8*
		5 mg.L ⁻¹	6	12,3	66,7	22,5	0,0	110,7 ± 14,3*
		CP	6	0,0	72,0	28,0	0,0	128,0 ± 3,4*

Os valores representam a média ± EP. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

As análises do número de nucleóides danificados revelaram um aumento significativo de pouco mais de 3 vezes, após 1 h de exposição à menor concentração de RT, em relação ao CN; assim como um aumento significativo de cerca de 4 vezes na maior concentração de RT em relação ao CN. Neste tempo experimental os eritrócitos do grupo CN apresentaram número de nucleóides danificados significativamente menores que o CP (tabela 2).

O aumento significativo no número de nucleóides danificados dos eritrócitos expostos às duas concentrações de RT em relação ao CN se mantiveram nos tempos de 3 e 6 h, bem como os eritrócitos do grupo CP apresentaram danos nos nucleóides significativamente maiores que os encontrados nos seus respectivos grupos CN (Tabela 2).

3.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados obtidos para a produção de ERO, nos eritrócitos expostos ao glifosato, mostraram que houve um aumento significativo apenas na concentração de 1 mg.L^{-1} de glifosato, no tempo de exposição de 1 h quando comparado ao seu respectivo CN. O mesmo não foi encontrado nos demais tempos experimentais e nem na maior concentração estudada (5 mg.L^{-1}) (Figura 3).

A análise da capacidade antioxidante total indicou um aumento significativo desta capacidade apenas nos eritrócitos expostos à menor concentração do glifosato, após 1 h de exposição, em relação ao respectivo CN, como mostrado na Figura 4.

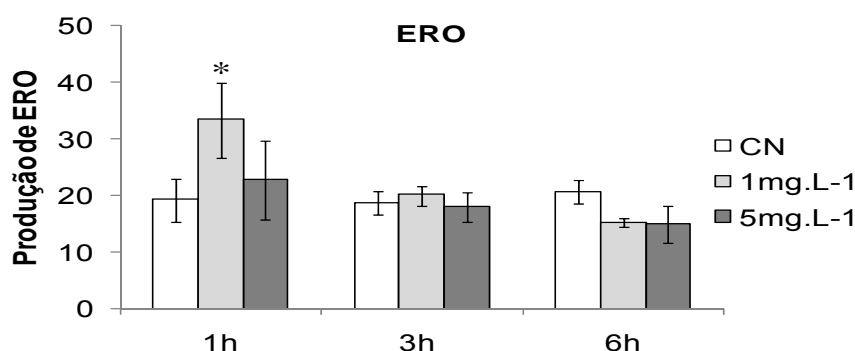


Figura 3 – Produção de ERO dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN) e ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

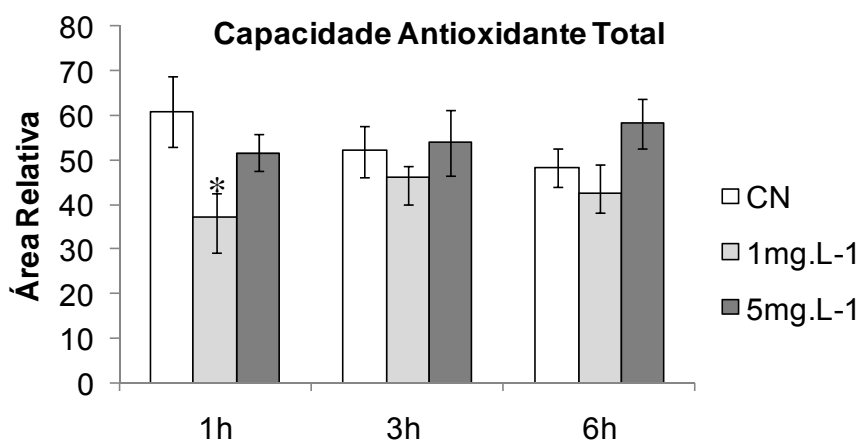


Figura 4 – Capacidade antioxidante total dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN) e ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

Os resultados obtidos para os eritrócitos expostos ao RT, mostraram que apenas após 1 h de exposição à 5 mg.L⁻¹ de RT houve um aumento significativo da geração de ERO em relação ao CN (Figura 5) acompanhado por um decréscimo significativo da capacidade antioxidante total (Figura 6). Nos demais tempos a produção de ERO, assim como a CAO, não diferiram no aumento ou diminuição significativa em relação ao CN.

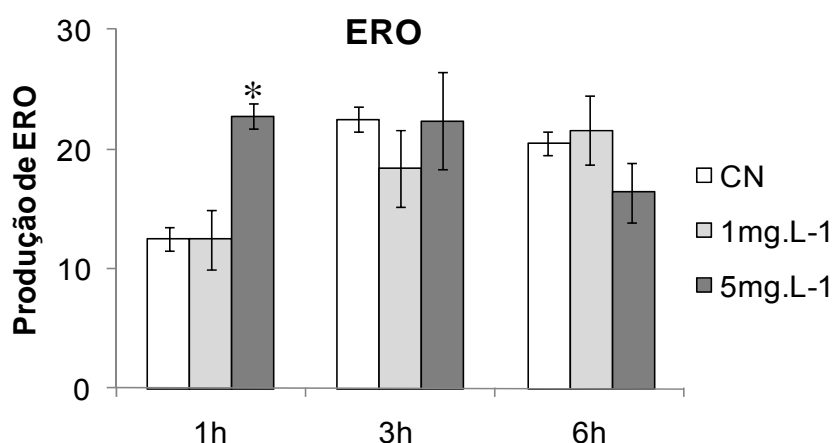


Figura 5 – Produção de ERO dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN) e ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

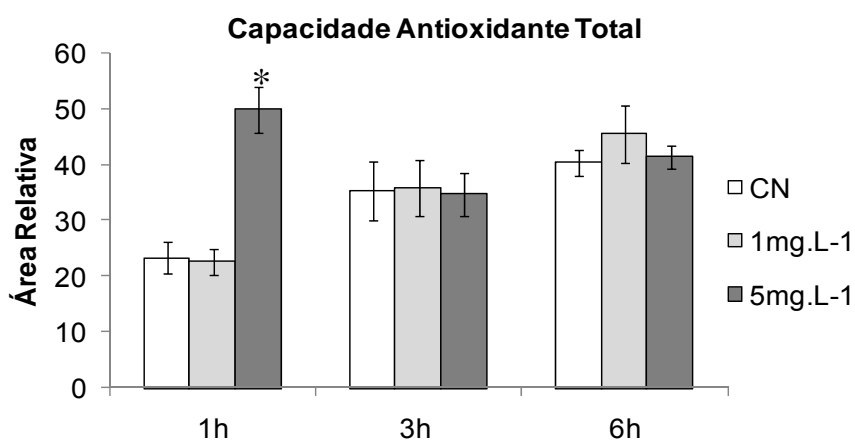


Figura 6 – Capacidade antioxidante total dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN) e ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹), após os tempos de exposição de 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão. * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

3.3 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA

O ensaio de difusão do DNA, utilizado neste trabalho, para verificar a frequência de células apoptóticas e necróticas, após a exposição *in vitro* dos eritrócitos ao glifosato, revelou aumento significativo de células apoptóticas no CN e CP ao longo dos tempos experimentais de 3 e 6 h, bem

como nos eritrócitos expostos a 1 mg.L^{-1} de glifosato após 3 h, em relação à primeira hora de exposição nestes grupos. Já para frequência de células necróticas foi verificado aumento significativo nos eritrócitos expostos à 1 mg.L^{-1} de glifosato por 3h, quando comparado a 1h de exposição nesta mesma concentração e no CP, também, ao longo dos tempos experimentais de 3 e 6 h em relação ao CP no tempo inicial de 1 hora (Tabela 3).

Os resultados obtidos na avaliação da frequência de células apoptóticas e necróticas para os eritrócitos expostos ao RT, revelaram aumento significativo na presença de células apoptóticas apenas em 1 mg.L^{-1} de RT nos tempos de 3 e 6 h quando comparados ao tempo de exposição de 1h para esta mesma concentração. Já para a ocorrência de células necróticas, foi encontrado aumento significativo no CN nos tempos de 3 e 6 h em relação ao CN de 1 h (Tabela 4).

Tabela 3 – Frequência de células apoptóticas e necróticas dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN), ao glifosato (1 mg.L^{-1} e 5 mg.L^{-1}) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h.

Frequência Média e Erro Padrão						
Tecido	Tempo	Grupo	N	Normal	Apoptose	Necrose
Eritrócitos	1h	CN	6	$200,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
		1 mg.L^{-1}	6	$200,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
		5 mg.L^{-1}	6	$200,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
		CP	6	$200,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
	3h	CN	6	$191,0 \pm 3,9$	$6,4 \pm 3,03^a$	$2,6 \pm 1,7$
		1 mg.L^{-1}	6	$185,0 \pm 9,3$	$8,5 \pm 6,6^b$	$6,0 \pm 2,7^b$
		5 mg.L^{-1}	6	$198,8 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,3$
		CP	6	$176,0 \pm 11,2$	$9,3 \pm 4,6^c$	$14,7 \pm 9,7^c$
	6h	CN	6	$195,7 \pm 2,9$	$4,0 \pm 3,0^a$	$0,3 \pm 0,2$
		1 mg.L^{-1}	6	$198,8 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,5$
		5 mg.L^{-1}	6	$197,7 \pm 1,7$	$1,8 \pm 1,6$	$0,5 \pm 0,2$
		CP	6	$168,0 \pm 13,3$	$20,7 \pm 13,2^c$	$11,3 \pm 3,5^c$

Os valores representam as médias e o erro padrão. ^a diferença significativa do grupo CN de 1 h ($P < 0,05$); ^b diferença significativa da exposição de 1 mg.L^{-1} de 1 h ($P < 0,05$); ^c diferença significativa da exposição do CP de 1 h ($P < 0,05$).

Tabela 4 – Frequência de células apoptóticas e necróticas dos eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à PBS (CN), ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) e ao MMS (CP) após 1, 3 e 6 h.

Frequência Média e Erro Padrão						
Tecido	Tempo	Grupo	N	Normal	Apoptose	Necrose
Eritrócitos	1h	CN	6	195,8 ± 2,3	1,3 ± 1,2	2,8 ± 1,5
		1 mg.L ⁻¹	6	195,7 ± 1,5	0,8 ± 0,5	3,5 ± 1,5
		5 mg.L ⁻¹	6	189,0 ± 6,7	6,0 ± 4,2	5,0 ± 2,6
		CP	6	185,7 ± 10,8	10,8 ± 10,1	3,5 ± 2,6
	3h	CN	6	84,8 ± 4,2	4,0 ± 2,4	11,2 ± 2,6 ^a
		1 mg.L ⁻¹	6	177,3 ± 11,2	7,7 ± 4,6 ^b	15,0 ± 7,7
		5 mg.L ⁻¹	6	186,7 ± 2,8	3,8 ± 2,7	9,5 ± 3,3
		CP	6	187,4 ± 7,0	1,2 ± 0,9	11,4 ± 6,8
	6h	CN	6	184,0 ± 5,5	6,4 ± 3,7	9,6 ± 2,6 ^a
		1 mg.L ⁻¹	6	173,6 ± 7,1	14,6 ± 7,0 ^b	11,8 ± 2,6
		5 mg.L ⁻¹	6	190,2 ± 3,4	3,2 ± 1,6	6,7 ± 1,9
		CP	6	161,6 ± 13,1	24,8 ± 13,9	13,6 ± 2,9

Os valores representam as médias e o erro padrão. ^a diferença significativa do grupo CN de 1 h (P < 0,05); ^b diferença significativa da exposição de 1 mg.L⁻¹ de 1 h (P < 0,05).

3.4 TEMPO DE RETENÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

As análises do tempo em que o corante vermelho neutro leva para atingir o citosol da célula mostraram que a membrana dos lisossomos, presentes nos eritrócitos expostos ao glifosato, só sofreram desestabilização na maior concentração testada, no tempo de 3 e 6 h, após 50 e 20 minutos de incubação das células no corante comparado ao CN, como mostra a Figura 7.

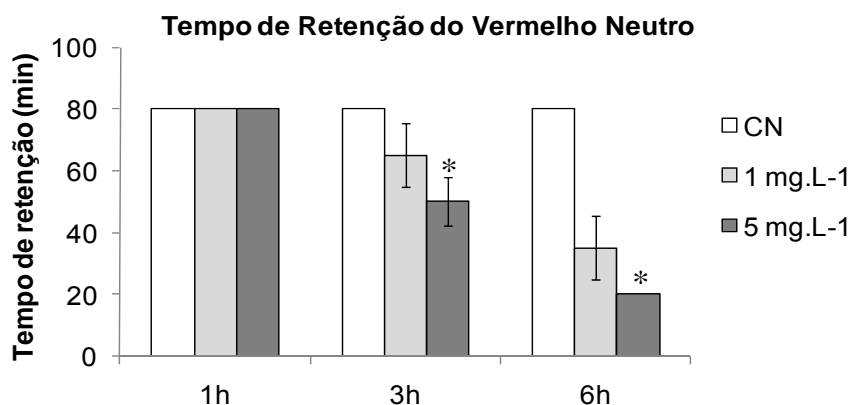


Figura 7 – Tempo de Retenção do corante vermelho neutro em lisossomos presentes nos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à PBS (CN) ou ao glifosato (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

Os resultados obtidos neste experimento mostraram que o RT começou a exercer efeito sobre a estabilidade da membrana lisossomal a partir do tempo de 1h, na maior concentração, após 50 minutos de incubação dos eritrócitos no corante quando comparado ao CN. Em 3 h de exposição, já ocorreu a desestabilização em 20 minutos, nas duas concentrações de RT e na exposição de 6 h, a concentração de 1 mg.L⁻¹ levou 50 minutos para apresentar desestabilização, porém 5 mg.L⁻¹ continuou apresentando desestabilização em 20 minutos de incubação em relação ao CN (Figura 8).

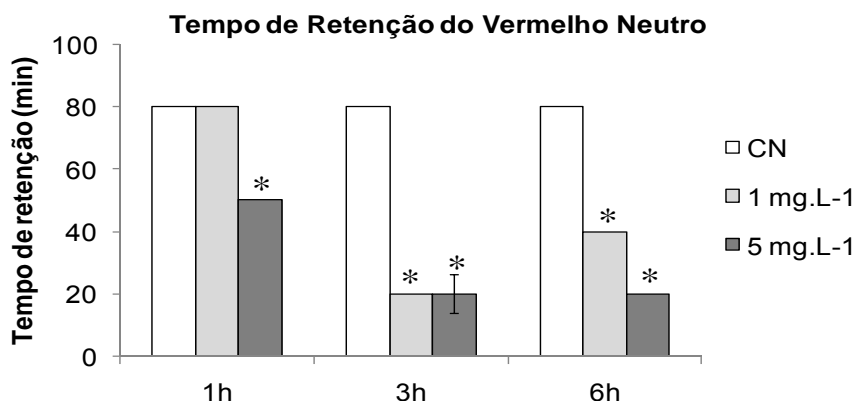


Figura 8 – Tempo de Retenção do corante vermelho neutro em lisossomos presentes nos eritrócitos de *P. lineatus*, expostos apenas à PBS (CN) ou ao RT (1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) após 1, 3 e 6 h. As barras representam as médias e as linhas verticais representam o erro padrão (N de 6). * diferença significativa em relação ao CN (P < 0,05).

4 DISCUSSÃO

Vários tipos de células isoladas de peixes, anfíbios e mamíferos, tais como eritrócitos, linfócitos, hepatócitos e linhagens permanentes, têm sido utilizados para avaliação de compostos genotóxicos por meio do ensaio do cometa em sistemas *in vitro* [36]. Alguns trabalhos já mostraram que as células sanguíneas dos peixes são sensíveis a tratamentos *in vitro*. Nacci *et al.* [37] verificaram o aumento no comprimento da cauda do cometa em células vermelhas de linguado (*Pleuronectes americanus*) expostas ao peróxido de hidrogênio. Cotelle; Féraud [38] observaram que eritrócitos de truta arco-íris (*Salmo irideus*) incubados em condições de estresse oxidativo estão sujeitos a danos na membrana e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, que pode levar a hemólise.

Um agente que interage com a molécula de DNA, causando danos genotóxicos ou mutagênicos, escolhido para constituir o controle positivo do ensaio do cometa e do ensaio de difusão do DNA *in vitro* foi o metil metanosulfonato (MMS). Outros trabalhos já fizeram uso deste composto devido

seu potencial intercalante [39, 40]. Este agente tóxico foi selecionado para este tipo de experimento, porque interage com a molécula de DNA sem a necessidade de ativação metabólica [41]. Os nossos resultados mostraram que o MMS interagiu com a molécula de DNA dos eritrócitos do *P. lineatus*, dando origem a danos superiores aos encontrados no CN, validando assim o ensaio do cometa *in vitro* realizado neste trabalho. No ensaio de difusão do DNA, o MMS induziu o aparecimento de células apoptóticas e necróticas, porém não foram em quantidades significativamente maiores que os encontrados no CN, muito provavelmente, devido à dispersão dos resultados.

Neste trabalho o ensaio do cometa *in vitro* utilizando eritrócitos de *P. lineatus* expostos ao glifosato por 1, 3 e 6 h relevou lesões no DNA apenas após 1 h de exposição à concentração de 1 mg.L^{-1} , diferente dos resultados obtidos para o RT, que revelaram danos no DNA nos três tempos experimentais e nas duas concentrações testadas. Mañas *et al.* [42] utilizando uma linhagem de células humanas (Hep-2) expostas a 3 mM de glifosato, por 4 h, encontraram danos no DNA muito elevados quando comparados com seu respectivo controle negativo. A quantidade de glifosato utilizada por este autor foi menor que a testada neste trabalho. No entanto, os efeitos dessa menor concentração de glifosato se comparam aos resultados obtidos no teste com RT, mostrando que as células utilizadas por esses autores podem ser mais sensíveis que as utilizadas no presente estudo.

A fim de entender a origem dos possíveis danos no DNA nos testes *in vitro* foi utilizado um ensaio que detecta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como, avalia a capacidade antioxidante total (CAO). Este ensaio pode ser empregado neste tipo de estudo, levando-se em consideração que os eritrócitos dos peixes são um importante local para a produção de ERO, devido ao seu papel no transporte de oxigênio via hemoglobina, e devido ao uso de oxigênio. Além disso, como os compostos químicos tóxicos são absorvidos e transportados através da corrente sanguínea, eles entram em contato direto com os eritrócitos, que por sua vez, estão entre as primeiras células a sofrer efeitos tóxicos [43].

Deste modo, os resultados obtidos para os eritrócitos expostos ao glifosato também mostraram aumento da produção de ERO apenas no menor tempo e concentração, acompanhado pelo aumento da CAO e, ainda, aumento da produção de ERO e diminuição da CAO nos eritrócitos expostos à de 5 mg.L⁻¹ ao RT. Estes resultados mostram que os danos encontrados pelo ensaio do cometa, nestas duas condições, têm provavelmente origem oxidativa. Já foi relatado na literatura que danos ao DNA podem ocorrer em resposta a várias formas diferentes de estresse oxidativo, em muitos tipos de células [30]. Acredita-se que essas lesões oxidativas no DNA são induzidas principalmente pelos radicais hidroxil que podem afetar as ligações das fitas da molécula de DNA, fazendo com que aconteçam quebras [15], que podem ser detectadas pelo ensaio do cometa.

Outro ensaio utilizado neste trabalho, com o intuito de entender como os eritrócitos respondem a estes herbicidas, foi o ensaio de difusão do DNA, que identifica morte celular por apoptose e/ou necrose. Este ensaio é uma ferramenta muito útil neste tipo de avaliação, pois quando um estressor químico induz danos que ultrapassam a capacidade de reparo da molécula de DNA, processos como apoptose e/ou necrose podem ser induzidos, aparecendo durante a progressão da condição de estresse [44]. Segundo Singh [21] a apoptose é um processo dependente de energia, que requer ativação de proteínas, genes e macromoléculas celulares, e parece ser induzido por estímulos genotóxicos leves; enquanto a necrose parece ser estimulada por danos genotóxicos severos, pois danos em um grau elevado impossibilitariam a célula de sinalizar a morte programada.

Os resultados obtidos para a exposição dos eritrócitos tanto ao glifosato, quanto ao RT, não foram em quantidade suficiente para inferir que um ou outro agente testado induz morte por apoptose ou necrose, devido a estímulos genotóxicos leves ou severos. Portanto, apesar do RT ter apresentado danos elevados no DNA, conforme detectado pelo ensaio do cometa, nos três tempos experimentais, estes danos não foram suficientes para induzir nenhum desses dois tipos de morte celular. Apesar dos resultados deste trabalho não terem apresentado aumento de células apoptóticas nos grupos experimentais, outros

autores, como Binelli *et al.* [13], verificaram que o Triclosan (agente bactericida) e o Trimetoprim (antibiótico) induzem a ocorrência de danos na molécula de DNA, bem como induzem o processo de apoptose em hemócitos do bivalve de água doce, *Dreissena polymorpha*.

Por fim, o quarto ensaio utilizado neste trabalho foi o TRVN, com o objetivo de verificar se o glifosato e o RT interagem com os lisossomos, e causam danos indiretos ao DNA através da liberação de enzimas que degradam esta biomolécula. Os resultados obtidos mostraram que o glifosato tem menor efeito sobre os lisossomos que o RT, o qual agiu sobre a estabilidade da membrana desta organela já no primeiro tempo experimental. Esses resultados podem ser explicados devido ao fato do RT possuir um surfactante aniônico em sua fórmula, que é capaz de se ligar aos lipídios de membrana e formar micelas, podendo assim, se ligar aos fosfolipídios desestabilizando ou rompendo a membrana biológica [45]. Stefanoni e Abessa [46] expuseram mexilhões (*Perna perna*) a um surfactante aniônico, conhecido como alquilbenzeno sulfonato linear, por 24 h, e verificaram desestabilização da membrana dos lisossomos. Estes autores comentam que um dos fatores que pode estar envolvido na fragilização desta membrana é a interação do surfactante aniônico com as proteínas e os fosfolipídios da membrana. Sendo assim, o mesmo pode ter acontecido com os lisossomos dos eritrócitos expostos ao RT, pois este produto além de conter um surfactante aniônico possui uma mistura de surfactante desconhecida, a qual pode interagir com as proteínas e fosfolipídios da membrana e causar uma desestabilização, que não foi encontrada nos eritrócitos expostos ao glifosato. Ainda, as enzimas liberadas pelos lisossomos no interior na célula podem contribuir para o aumento de danos na molécula de DNA, como foi constatado pelo ensaio do cometa.

Os resultados obtidos com os experimentos *in vitro* mostraram que o RT tem um efeito maior sobre os eritrócitos de *P. lineatus* quando comparado com seu princípio ativo, pois pudemos observar seu elevado grau de genotoxicidade pelos resultados obtidos no ensaio do cometa. Pode ser verificado, também, que esta alta quantidade de danos observados na molécula de DNA dessas células, não são exclusivamente de origem oxidativa, porque os

resultados obtidos pelo tempo de retenção do vermelho neutro sugerem que estes danos podem ter relação com as enzimas liberadas no interior da célula devido à desestabilização dos lisossomos e que esses danos não causaram morte por apoptose e/ou necrose, o que pode sugerir que o sistema de reparo esteja atuando de forma que os danos fiquem em um nível tolerável por essas células.

AGRADECIMENTOS.

Os autores agradecem a Estação de Piscicultura da UEL pelo fornecimento dos peixes, a CAPES pela bolsa de mestrado concedida a N.C. Moreno e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL pelo apoio concedido. C.B.R. Martinez é bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] K. R. Solomon, D. G. Thompson, Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate, *J. Toxicol. Env Health. Part B* – 6 (2003) 289–324.
- [2] M. T. K. TSUI, L. M. CHU, Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52(7) (2003) 1189–1197.
- [3] M. H. Inoue, JR. Oliveira, J. B. Reginato, C. A. Tormena, V. L. Tornisielo, J. Constantin, Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná, *Planta Daninha*, 21 (2003)313-323.
- [4] I. M. HEAP, The occurrence of herbicide resistant weeds world wide, *Pest. Scien.* 51 (1997) 235-243.
- [5] J. E. Franz, M. K. MAO, J. A. Sikorski, *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*, ACS Monograph 189. Am. Chem. Soc. (ACS). Washington, DC, 1997.
- [6] G. M. Williams, R. Kroes, I. C. Munro, Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans, *Regul. Toxicol. Pharm.* 31 (2000) 117-165.
- [7] O. P. Jr. Amarante, T. C. R. Santos, N. M. Brito, M. L. Ribeiro, Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação, *Química Nova* 25 (2002) 589–593.
- [8] C. F. B. Coutinho, L. H. MAZO, Complexos metálicos com o herbicida glifosato: Revisão, *Química Nova* 28 (2005) 1038-1045.
- [9] J. P. Giesy, S. Dobson, K. R. Solomon, Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide, *Environ. Contam. Toxicol.* 167 (2000) 35–120.
- [10] Bula do Roundup Transorb.
<http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/fichas-de-emergencia-e-bulas/pdf/roundup-transorb-bula.pdf>. Disponível em 14 de julho de 2010.
- [11] C. M. Howe, M. Berrill, D. B. Pauli, C. C. Helbing, K. Werr, N. Veldhoen, Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species, *Environ Toxicol Chem.* 23 (2004) 1928–1938.

- [12] A. Totii, A. Y. Chida, H. K. Tomita, J. Porto, L. L. Ogura, S. Leal, Marcadores de Poluição, Química das Águas. QFL – 3201. São Paulo, 11/06/2007.
- [13] A. Binelli, D. Cogni, M. Parolini, C. Riva, A. Provini, *In vivo* experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes, *Aquatic Toxicology* 91 (2009) 238–244.
- [14] J. I. R. Porto, C. S. O. Araújo, E. Felberg, Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species, *Environ. Res.* 97 (2005) 287–292.
- [15] T. Ohe, T. Watanabe, K. Wakabayashi, Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.* 567 (2004) 109–149.
- [16] 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.
- [17] D. W. Fairbairn, P. L. Olive, K. L. O'Neill, The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339 (1995) 37–59.
- [18] C. Paz-y-Minõ, M. V. Dávalos, M. E. Sánchez, M. Arévalo, P. E. Leone, Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay, *Mutat. Res.* 516 (2002) 57–61.
- [19] F. E. Matsumoto, I. M. S. Cólus, Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate, *Genet. Mol. Biol.* 23 (2000) 489–492.
- [20] A. N. Jha, Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview, *Mutat. Res.* 552 (2004) 1–17.
- [21] N. P. Singh, A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells, *Exp. Cell Res.* 256 (2000) 328–337.
- [22] R. M. J Gogal, B. J. Smith, J. Kalnitsky, S. D. Holladay, Analysis of Apoptosis of Lymphoid Cells in Fish Exposed to Immunotoxic Compounds, *Cytometry* 39 (2000) 310–318.
- [23] R. Franco, R. Sánchez-Ole, E. M. Reyes-Reyes, I. M. Panayiotidi, Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois, *Mutat. Res.* 674 (2009) 3–22.

- [24] M. L. S Mello, R. F. Castilho. Morte Celular. In: Carvalho, H. F. e Recco-Pimentel, S. M. A célula. segunda ed. Barueri, SP: Manole, 2007, pp. 364-373.
- [25] H. Babich, E. Borenfreund, Applications of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology, *Alternat. Lab. Animals* 18 (1990) 129–144.
- [26] N. Koukouzika, V. K. Dimitriadis, Multiple Biomarker Comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece Coast: “Lysosomal Membrane Stability, Neutral Red Retention, Micronucleus Frequency and Stress on Stress”, *Ecotoxicology* 14 (2005) 449–463.
- [27] A. Valavanidis, T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M. Scoullou, Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotox. Environ. Safe.* 64 (2006) 178–189.
- [28] B. Halliwell, J. M. C Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 3ª Edição, New York: Oxford University Press, 1999.
- [29] H. Sies, Strategies of antioxidant defense, *Europ. J. Biochem.* 215 (1993) 213-219.
- [30] M. Hermes-Lima, Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B. (ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*, New York, John Wiley & Sons, Inc., 2004, pp. 319-368.
- [31] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider, A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [32] H. Kobayashi, C. Suguyama, Y. Morikawa, M. Hayashi, T. Sofuni, A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis, *MMS. Commun.* 3, (1995) 103–115.
- [33] L. L. Amado, M. Garcia, P. B. Ramos, R. F. Freitas, B. Zafalon, J. L. R. Ferreira, J. S. Yunes, J. M. Monserrat, A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity, *Science of the Total Environment* 407 (2009) 2115–2123.
- [34] M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254. 1976

- [35] D. M. Lowe, e R. K. Pipe, Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study, *Aquatic Toxicology* 30, 357-365, 1994.
- [36] R. F. Lee e S. Steinert, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutation Research* 544 43–64. 2003.
- [37] D. E. Nacci, S. Cayula, E. Jackim, Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquatic Toxicol.* 35, 197-210, 1996.
- [38] S. Cotelle, J. F. Férard, Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34 (1999) 246-255.
- [39] Á. M. M. C. Gontijo, R. E. Barreto, G. Speit, V. A. V. Reyes, G. L. Volpato, D. M. F. Salvadori, Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results, *Mutat. Res.* 534 (2003) 165–172.
- [40] E. Lacaze, O. Geffard, S. Bony, A. Devaux, Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay, *Mutat. Res.* 700 (2010) 32–38.
- [41] 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/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.
- [42] F. Mañas, I. Peralta, J. Raviolo, H. G. Ovando, A. Weyers, I. Ugnia, M. G. Cid, I. Larripa, N. Gorla, Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests, *Environ. Toxicol. Phar.* 28, 37–41. 2009.
- [43] C. Ruas, C. Carvalho, H. de Araújo, E. Espíndola, M. Fernandes, Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river, *Ecotox. Environ. Safe.* 71 (2008) 86–93.
- [44] S. A. Steinert, Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells, *Mar. Environ. Res.* 42 (1996) 253-259.
- [45] T. Cserhádi, E. Forgács, G. Oros, Biological activity and environmental impact of anionic surfactants, *Environ. Int.* 28 (2002) 337– 348.

[46] M. F. Stefanoni, D. M. S. Abessa, Lysosomal Membrane Stability of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) exposed to the anionicsurfactant Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS), Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 3 (2008) 6-9.

CONCLUSÕES

➤ Como revelado pelos testes *in vivo*, tanto o glifosato quanto o RT causaram danos à molécula de DNA de *P. lineatus* de forma mais acentuada nos eritrócitos do que nas células branquiais. Por outro lado, o princípio ativo e o produto formulado, nesses mesmos testes, não exerceram efeito mutagênico no DNA dos eritrócitos.

➤ Nos testes *in vitro* foi verificado que os danos no DNA nas células expostas ao glifosato podem ser de origem oxidativa, levando-se em consideração o aumento na produção de ERO; já os danos encontrados após exposição ao RT não tem relação aparente com a geração de espécies reativas de oxigênio. Os resultados obtidos pelo ensaio do TRVN sugerem que os danos causados pela exposição ao RT podem ter relação com as enzimas liberadas no interior das células devido a desestabilização lisossômica. Entretanto, esses danos não foram suficientes para induzir morte por apoptose/necrose.

➤ Os resultados obtidos no ensaio do cometa nos testes *in vivo* e em *in vitro* com eritrócitos, mostraram que estes dois sistemas apresentaram resultados diferentes no que diz respeito ao glifosato, já que a quantidade de danos encontrados nessas células foi mais significativa nas exposições *in vivo* do que nas *in vitro*. Estes resultados ressaltam a importância da utilização destes dois sistemas teste nesse tipo de estudo, levando-se em consideração as diferentes respostas encontradas.

➤ O uso de testes *in vivo* e *in vitro*, juntamente com as técnicas empregadas neste trabalho, demonstrou ser uma valiosa ferramenta para a compreensão dos mecanismos de toxicidade do glifosato e do RT sobre a molécula de DNA do *P. lineatus*.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/tox/manual/anexo_03.htm>. Acesso em: 15 maio 2010.
- AI-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**. 343, 121-135, 1995.
- AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANIE, B.; KNEZ, S. E STEGNAR, P. Chromium induced micronuclei in fish. **Journal of Applied Toxicology**. 14, 333-336, 1994.
- AMADO, L. L.; GARCIA, M.; RAMOS, P. B., FREITAS, R. F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J. L. R; YUNES, J. S.; MONSERRAT, J. M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**. 407, 2115–2123, 2009.
- AMARANTE, O. P. J.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. **Química Nova**. 25, 589–593, 2002.
- AMORIM, L. C. A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Revista Brasileira Epidemiologia**. 6, 158-170, 2003.
- ARKHIPCHUK, V.V.; GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on *in vivo* fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 62, 42–52, 2005.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**. 467, 177–186, 2000.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CARVALHO, H. F. Lisossomos. In: Carvalho, H. F. e Recco-Pimentel, S. M. **A célula**. Segunda Edição. Barueri, SP: Manole, Pg. 199-210, 2007.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. **Alternative Laboratory Animals**. 18, 129–144, 1990.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with the Neutral Red Cell Viability Assay. **Applied and Environmental Microbiology**. 57, 2101-2103, 1991.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Ed. Bookman. Porto Alegre, 2a ed., 2002.

BARJA, B. C.; HERSZAGE, M.; AFONSO, M. S. Iron (III) - phosphonate complexes. **Polyhedron**. 20, 1821-1830, 2001.

BARSIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKENAITE, L.; ANDERSEN, O. K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**. 78, S99–S104, 2006.

BENNEMANN, S. T.; SILVA-SOUZA, A. T. ; ROCHA, G. R. A. Composicion inctiofaunistica em cinco localidades de La cuenca Del rio Tibagi PR – Brasil. **Interciência**. 20, 7-13, 1995.

BERTOLETTI, E. Ensaio Biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle de poluição. **Cetesb**, São Paulo, 1990.

BINELLI, A.; COGNI, D.; PAROLINI, M.; RIVA, C.; PROVINI, A. In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes. **Aquatic Toxicology**. 91, 238–244, 2009.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry Journal**. 72, 248-254. 1976

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutation Research**. 531, 37–80, 2003.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**. 543, 251–272, 2003.

BULA DO ROUNDUP TRANSORB. Disponível em:
<<http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/fichas-de-emergencia-e-bulas/pdf/roundup-transorb-bula.pdf>>. Acesso em: 14 julho 2010.

CAJARAVILLE, M. P. U.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTED, C.; SARASQUETE, C., VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**. 247, 295-311, 2000.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, J. M.; BLASCO, J.; Porte, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**. 247, 295-311, 2000.

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**. 21, 61–69. 2006.

CANDIOTI, J. V.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). *Mutation Research*. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.08.018. 2010.

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**. 47, 2123-2436. 1990.

CASTILHO, L. E.; LA CRUZ, E.; RUEPERT, C. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 16, 41-51, 1997.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. **Check list of the freshwater fishes of south and central America**. Family Prochilodontidae. Porto Alegre: EDIPUCRS. Pg. 71-84, 2003.

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

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

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

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery

and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**. 74, 264–271, 2005.

ÇAVAS, T.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**. 22, 263–268. 2007.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M. J.; SCARABOTTI, P. A.; WUNDERLIN, D. A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**. 157, 3025–3033. 2009.

CEREJEIRA, M.J., VIANA, P., BATISTA, S., PEREIRA, T., SILVA, E., VALÉRIO, M.J., SILVA, A., FERREIRA, M., SILVA-FERNANDES, A.M. Pesticides in Portuguese surface and ground Waters. **Water Research**. 37, 1055-1063, 2003.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005.

CONNERS, D. E.; BLACK, M. C. Evaluation of Lethality and Genotoxicity in the Freshwater Mussel *Utterbackia imbecillis* (*Bivalvia: Unionidae*) Exposed Singly and in Combination to Chemicals Used in Lawn Care. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 46, 362–371, 2004.

COOPER, C.M. Biological effects of agriculturally derived surface-water pollutants on aquatic systems – a review. **Journal of Environmental Quality** 22, 402-408, 1993.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 34, 246-255, 1999.

COUTINHO, C. F. B. E. MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: Revisão. **Química Nova**. 28, 1038-1045, 2005.

CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environment International**. 28, 337– 348, 2002.

DAAM, M. A. E VAN DEN BRINK, P. J. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**. 19, 24–37, 2010.

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

DI GIULIO, R. T.; HINTON, E. D. **The Toxicology of fishes**. Ed. CRC Press. Pg. 274-300, 2008.

EPA. GLYPHOSATE. EPA-738-F-93-011. September, 1993.

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

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

FEDATO, R.P.; SIMONATO, J.D.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. **Mutation Research**. 700, 80–85, 2010.

FERREIRA, C.M. Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental **Biológico**. 65, 17-18, 2002.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 37, 659-667, 2002.

FISPQ. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos**. Roundup Transorb®. Revisão 2. 12/05/2008.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLE, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDI, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research**. 674, 3–22, 2009.

FRANZ, J. E., MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. Glyphosate: A Unique Global Herbicide, **ACS Monograph** No. 189. **Am. Chem. Soc. (ACS)**. Washington, DC, 1997.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS; B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**. 681, 80–92, 2009.

FRENZILLI, G; SCARCELLI, V; BARGA, I; NIGRO, M; FORLIN, L; BOLOGNESI, C; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour. **Mutation Research**. 552, 187-195, 2004.

GALINDO, B. A.; TROILO, G.; CÓLUS, I. M. S.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. **Water, Air and Soil Pollution**. 212, 419–428, 2010.

GIESY, J.P., DOBSON, S., SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Environmental Contamination and Toxicology**. 167, 35–120, 2000.

GOGAL, R.M. J.; SMITH, B.J.; KALNITSKY, J.; HOLLADAY, S.D. Analysis of Apoptosis of Lymphoid Cells in Fish Exposed to Immunotoxic Compounds. **Cytometry**. 39, 310-318, 2000.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L. R; Salvadori, D. M. F e Marques. E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA. Pg 247-279, 2003.

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

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

GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup—a glyphosate-based herbicide. **Mutagenesis**. 25, 523–530. 2010.

HALLIWELL, B. E GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3ª Edição. New York: Oxford University Press. 936 p. 1999.

HEAP, I. M. The occurrence of herbicide resistant weeds world wide. **Pesticide Science**. 51, 235-243, 1997.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B. (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York, John Wiley & Sons, Inc. Pg. 319-368, 2004.

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

HOWE, C.M.; BERRILL, M.; PAULI, D.B.; HELBING, C.C.; WERR, K.; VELDHOEN, N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 23, 1928–1938, 2004.

INOUE, M.H.; OLIBEIRA, JR.; REGINATO, J.B.; TORMENA, C.A.; TORNISIELO, V.L.; CONSTANTIN, J. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná. **Planta Daninha**. 21, 313-323, 2003.

JACOMINI, A. E.; AVELAR, W. E. P.; MARTINEZ, A. S.; BONATO, P. S. Bioaccumulation of atrazine in freshwater bivalves *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) and *Cubircula fluminea* (Müller, 1774). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 51, 387-391, 2006.

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

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

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasileira**. 12, 680-693, 2008.

Jornal O Estado de São Paulo. Disponível em:
<http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not_imp414820,0.php>.
Acesso em: 16 mar 2011.

KAPPUS, H.; SIES, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism, redox cycling and lipid peroxidation. **Experientia**. 37, 1233–1241, 1981.

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 intertidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 44, 56-64, 2004.

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

KONEN, S.; ÇAVAS, T. Genotoxicity Testing of the Herbicide Trifluralin and Its Commercial Formulation Treflan Using the Piscine Micronucleus Test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 49, 434-438. 2008.

KONSTANTINOOU, I. K.; HELA, D. G.; ALBANIS, T. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**. 141, 555-570, 2006.

KOUKOUZIKA, N.; DIMITRIADIS, V.K. Multiple Biomarker Comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece Coast: "Lysosomal Membrane Stability, Neutral Red Retention, Micronucleus Frequency and Stress on Stress". **Ecotoxicology**. 14, 449-463, 2005.

KUEHL, D.W.; SERRANO, J.; NAUMANN, S. Identification of potentially mutagenic contaminants in the aquatic environment by liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric characterization of *in vitro* DNA adducts. **Journal of Chromatograph A**. 684, 113-119. 1994.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, ST. P.; JHA, A. N. Comet Assay measurements: a perspective. **Cellular Biology and Toxicology**. 25, 53-64, 2009.

LACAZE, E.; GEFFARD, O.; BONY, S.; DEVAUX, A. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. **Mutation Research**. 700, 32-38, 2010.

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

LACKNER, R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.). **Fish Ecotoxicology**. Birkhauser Verlag. Basel. 203-224, 1998.

LAM, P. K.S., E GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**. 46, 182-186, 2003.

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**. Part C 147, 222-231, 2008.

LARSON, S. J., CAPEL, P. D., GOOLSBY, D. A.; ZAUGG, S. D. E SANDSTROM, M. W. Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi river basin. **Chemosphere**. 31, 3305-3321, 1995.

LEE, R. S. DNA Damage as a Biomarker of Exposure. **Ecotoxicology**. 9, 329-340, 2000.

LEITE DA VEIGA, M., RODRIGUEZ, E.L., PACHECO, F.J., TAVARES RANZANI-PAIVA, J. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of Trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 45, 171–175, 2002.

LEONHARDT, J. H.; FROSSARD, H.; FILHO, M. C. Piscicultura. In: MEDRI, M.E et al. (eds). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: Edição dos editores. Pg. 551-577. 2002.

LIMÓN-PACHECO, J. ; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**. 674, 137–147, 2009.

LLOYD, R. **Pollution and Freshwater Fish**. Fishing News Books, 1992.

LOWE, D.M.; PIPE, R.K. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. **Aquatic Toxicology**. 30, 357-365, 1994.

MAÑAS, F.; PERALTA, L.; RAVIOLO, J.; OVANDO, H. G.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; CID, M. G.; LARRIPA, I.; GORLA, N. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 28, 37–41. 2009.

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 et al. (eds). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: Edição dos editores, p. 551-577. 2002.

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

MELLO, M. L. S.; CASTILHO, R. F. Morte Celular. In: Carvalho, H. F. e Recco-Pimentel, S. M. **A célula**. Segunda Edição. Barueri, SP: Manole. Pg. 364-373, 2007.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**. 81, 781-787, 2010.

MOORE, M.N. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. **Histochemistry Journal**. 22, 187–191, 1990.

MOORE, M.N.; ALLEN, J.I.; MCVEIGH, A.; SHAW, J. Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. **Autophagy**. 2, 217-220, 2006.

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

NICHOLSON, S.; LAM, P.K. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). **Environment International**. 31, 121-132, 2005.

NICHOLSON, S. Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes. **Chemosphere**. 45, 399-407, 2001.

NIMMO, D.R. Pesticides. In: Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. (eds.) **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere. Pg. 335-373, 1985.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**. 567, 109–149, 2004.

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**. 83, 286-292, 2000.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I.V., VETMA, N.; ERBEN, R.; PAPES D. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. **Mutation Research**. 465, 145–150, 2000.

PAZ-Y-MINÑO. C.; DÁVALOS, M.V.; SÁNCHEZ, M. E.; ARÉVALO, M.; LEONE, P.E. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. **Mutation Research**. 516, 57 –61, 2002.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v.61, p.1115-1122. 2005.

PIONNER. <http://www.pioneersementes.com.br/ProdutosBiotecnologiaSojaRR.aspx>. Disponível em 7 de julho de 2010.

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

PRESTON, R. J. Genetic Toxicology. In: SMART, R. C. e HODGSON, E. **Molecular and Biochemical Toxicology**. Quarta Edição. Editora Wiley. Pg. 587-606. 2001.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S. E.; GONÇALVES F. F.; MACHADO, S. O. E.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição Teórica Monitoramento. **Química Nova**. 28, 605-609, 2005.

RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Ed. Taylor e Francis – 6ª Edição, pg. 18, 1995.

REGOLI, F.; GORBI, S.; FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; CORSI, I.; FOCARDI, S.; WINSTON, G.W. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**. 54, 419–423, 2002.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas** - 5ª Edição. Pg 275-289. Londrina, 2005.

RUAS, C.; CARVALHO, C.; DE ARAÚJO, H.; ESPÍNDOLA, E.; FERNANDES, M. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 71, 86–93, 2008.

SHARM, S.; NAGPUDE, N. S.; KUMAR, R.; PANDEY, S.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, P. J.. P. K. Mathur 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**. 53, 617–623, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**. 215, 213-219, 1993.

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**. 69, 112–120, 2008.

SIMONIELLO, M. F.; GIGENA, F.; POLETTA G.; LOTESTE, A.; KLEINSORGE, E.; CAMPANA, M.; SCAGNETTI, J.; PARMA, M. J. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bull Environmental Contamination Toxicology**. 83, 155–158, 2009.

SINGH, N. P. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. **Experimental Cell Research**. 256, 328-337, 2000.

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

SMITH, E. A.; OHEME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Veterinary and Human Toxicology**. 34, 531-543, 1992.

SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. Part B, 6, 289–324, 2003.

STEFANONI, M.F.; ABESSA, D.M.S. Lysosomal Membrane Stability of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) exposed to the anionicsurfactant Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**. 3, 6-9, 2008.

STEINERT, S. A. Contribution of Apoptosis to Observed DNA Damage in Mussel Cells. **Marine Environmental Research**. 42, 2X-259, 1996.

SHUGART, L. R. DNA Damage as a Biomarker of Exposure. **Ecotoxicology**. 9, 329-340, 2000.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D.J.; HANKARD, P.K.; WEEKS, J.M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 57, 20–29, 2004.

TALAPATRA, S.N.; BANERJEE, S.K. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. **Food and Chemical Toxicology**. 45, 210–215, 2007.

TIANO L.; FEDELI D.; SANTRONI AM.; VILLARINI M.; ENGMAN L.; FALCIONI G. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. **Mutation Research**. 464, 269–77. 2000.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 35, 206-221, 2000.

TOTTI, A.; CHIDA, A. Y.; TOMITA, H. K.; PORTO, J.; OGURA, L. L.; LEAL, S. Marcadores de Poluição. **Química das Águas**. QFL – 3201. São Paulo, 11/06/2007.

TSUI, M.T.K., CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**. 52, 1189–1197, 2003.

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

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 64, 178–189, 2006.

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

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

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**. 631, 36–43, 2007.

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**. 90, 42-51, 2008.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Res.* 1984; 18:653-694. In: Ana Rosa Linde Arias; Daniel Forsin Buss; Carla de Albuquerque; Alan Ferreira Inácio; Marina Moreira Freire; Mariana Egler, Riccardo Mugnai; Darcilio Fernandes Baptista. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agroquímicos. **Ciência & Saúde Coletiva**. 12 (1): 61-72, 2007.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**. 410, 223-36, 1998.

WILLIAMS, G. M., KROES, ROBERT E MUNRO I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 31, 117-165, 2000.

WINTER, M. J.; ELLIS, L. C.J., HUTCHINSON, T. H. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. **Mutation Research**. 629, 89-99. 2007.

WHO. Glyphosate. Environmental Health Criteria No. 159. **World Health Organization**, Geneva, 1994.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeito do Glifosato nas plantas: Implicações Fisiológicas e Agronômicas. International Plant Nutrition Institute. **Informações Agronômicas**. Nº 199, 2007.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Ed. Rima, 2006.