



Universidade
Estadual de Londrina

BRUNO AMBROZIO GALINDO

**Aplicação de Biomarcadores Genéticos
Para a Avaliação de Efeitos Genotóxicos
do Alumínio em Peixes *Prochilodus
lineatus***

LONDRINA

2007



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Bruno Ambrozio Galindo

**Aplicação de Biomarcadores Genéticos
Para a Avaliação de Efeitos Genotóxicos
do Alumínio em Peixes *Prochilodus
lineatus***

Londrina
2007

Bruno Ambrozio Galindo

**Aplicação de Biomarcadores Genéticos
Para a Avaliação de Efeitos Genotóxicos
do Alumínio em Peixes *Prochilodus
lineatus***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia

Londrina
2007

Bruno Ambrozio Galindo

**Aplicação de Biomarcadores Genéticos Para a
Avaliação de Efeitos Genotóxicos do Alumínio
em Peixes *Prochilodus lineatus***

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. **Maria Aparecida Marin-Morales**
Departamento de Biologia
UNESP/Rio Claro-SP

Prof. Dr. **Mário Sérgio Mantovani**
Departamento de Biologia Geral
CCB-UEL

Profa. Dra. **Silvia Helena Sofia**
Departamento de Biologia Geral
CCB-UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2007

À Deus
Por me dar a vida
e todos aqueles que dela fazem parte
em especial Pai, Mãe, Marina e Tia Joana

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral por possibilitar a realização deste trabalho;

À CAPES pelo concessão da Bolsa de Mestrado e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Silvia, mais que orientadora, amiga, companheira que soube me ensinar com suas palavras, mas muito mais me ensinou com seus atos e com seu jeito. À quem me faltam palavras pra agradecer. Quem eu quero levar o resto da minha vida. De quem eu terei orgulho de dizer que fui seu aluno.

À também amiga e orientadora Cláudia, com quem aprendi a amar os peixes, rios, lagos. Exemplo de profissional, competência de pessoa. Que sempre me acolheu quando eu precisei, e como precisei

A Silvia e Cláudia, minhas queridas orientadoras, que ao longo destes primeiros quatro anos de convivência, mais do que tutoras na minha carreira Acadêmico científica, foram minhas amigas e viveram comigo alguns momentos difíceis, mas também celebramos juntos muitas conquistas (GALINDO, B. A., 2004)

À Professora Leda e Professora Fernanda, pelas companhias, pelos valiosos ensinamentos, por todo carinho.

Às Professoras Ilce Mara Syllos Cólus e Berenice Quinzani Jordão, pelas dicas e ensinamentos.

Aos professores membros da Banca Examinadora, Dr. Mário Sérgio Mantovani e Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, pela disposição em participar da avaliação deste trabalho.

Aos técnicos do interlaboratório Dário e Melyssa, por toda ajuda e disponibilidade.

À Sueli, secretaria do Mestrado em Genética e Biologia Molecular, por toda ajuda, pelos lembretes, recados, orientações, protocolos, formulários etc.

A todos os colegas que me ensinaram e ajudaram nas aventuras pela mutagênese: Tatiana Vanzella, Mari, Jú Mara, Trovão.

Aos amigos do LEFA, Marta, Jú, Lú, Jaque, Carol, Lindalva, Gabriel.

À Marina, grande companheira de trabalho para todas as horas, até nas madrugadas que a larguei me esperando.

Ao amigo Rafael, Fiel Escudeiro para todas as horas e todos os momentos, valeu pelo seu sorriso e amizade, por todos os galhos quebrados etc, "tá maluco rapaz !"

À amiga Dalita, por abraçar este mestrado em muitos momentos junto comigo, me dando cobertura em muitos momentos, "Dalita NÃO!"

Ao amigo Juliano, pelas ajudas computacionais, metodológicas, pelas provas da Leda, por todas as aulas, pela paciência, pelos jogos do tubarão, pelos congressos, por tanta coisa, valeu.

Bom, à amiga Karen, se eu escrever qualquer coisa vai ser pouco menina, por tudo, tudo que você foi durante todos estes anos, por tudo que você fez por mim e por tudo que você representa pra mim, eu tenho certeza que você é um anjo que Deus enviou pra cuidar de mim durante todos estes anos, espero que ele nos permita caminhar juntos até quando Ele quiser. Lógico tenho que agradecê-la pelas queimaduras de U.V, pelos géis analisados, fotografados e devidamente documentados, é tanta coisa que para não correr o risco de esquecer nada vou deixar um espaço em branco só pra você, nele eu coloco o meu profundo agradecimento

[...]

de coração valeu amiga.

À todos os colegas inesquecíveis do Laboratório de Marcadores Moleculares e Ecologia de Abelhas:Yuldi, Miroca, Douglas, Gabi, Carluxa, Leandro, Olavo, fala verdade ciência e bom humor tem tudo a ver né !!!

A Fram, com quem aprendi, tanta, tanta coisa.... grande amiga!

Aos amigos da graduação, que continuam a me inspirar: Carlinha, Jerep, Nequinho (Wanner), Fabinho, Haroldo.

À Tê, que entrou na história deste mestrado aos 43min do segundo tempo, e apesar da minha ausência em tantos, tantos momentos, soube me dar amor, carinho, atenção, compreensão que com certeza foram um importante combustível nesta reta final.

A minha Família, Mãe, Marina, Pai, tia Joana, se não fossem vocês, com certeza não teria chegado até aqui, não vou escrever muito aqui, porque prefiro demonstrar com meus sentimentos toda gratidão. Amo todos vocês.

Aos Amigos, com quem eu desabafei, festejei, cantei, rezei e agora irei comemorar.

À Natureza, fonte de inspiração para trabalhar...

À Deus, que criou tudo e todos acima, por ser meu pai e meu objetivo.

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte mais feliz quem sabe
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei
E nada sei

...

É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva para florir

...

Todo mundo ama um dia
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
Um outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz...

(SATER, A.; TEIXEIRA, R.)

GALINDO, BRUNO AMBROZIO. Aplicação de biomarcadores genéticos para a avaliação de efeitos genotóxicos do alumínio em peixes *Prochilodus lineatus*. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina – PR.

RESUMO

As técnicas de RAPD, cometa e micronúcleo (MN) foram empregadas para avaliar o possível efeito genotóxico do metal alumínio em meio ácido (pH=5,0) para a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Os animais foram submetidos a exposições agudas (6h, 24h e 96h) e sub-crônica (15d), dos seguintes tratamentos: 0,1 mg Al dissolvido.L⁻¹ em pH 5 (Al+Ac); água com pH 5 (Ac); água com pH neutro (controle-negativo = CN) e, um controle-positivo submetido à uma dose de ciclofosfamida de 0,04 mg.g⁻¹ e amostrado após 24h (CP). Antes dos experimentos os peixes foram marcados e tiveram a nadadeira adiposa retirada para comparação dos perfis de RAPD pré e pós-exposição. Após as exposições, as brânquias e o fígado foram removidos para as análises de RAPD. Para os testes do cometa e MN, foi retirado sangue dos animais pela veia caudal. As análises de RAPD revelaram diferenças nos perfis de RAPD pré (nadadeira) e pós-exposição (brânquia e fígado) em 14 bandas nos tempos de (6h, 24h, 15d e CP); tais alterações observadas podem ser decorrentes de mutações nos sítios de ligação dos *primers* ou de inserções/deleções no DNA. O ensaio do cometa indicou aumentos significativos no número de nucleóides danificados e nos índices de dano celular (score médio) entre os seguintes tratamentos: 6h (Al+Ac x CN), 24h (Ac x CN; Ac x Al+Ac); e no controle-positivo (24h) quando comparado aos demais tratamentos, para todos os tempos experimentais. Em nenhum dos tratamentos realizados foi observado aumento na frequência de MN, que mantiveram níveis basais próximos a zero nos animais estudados. Assim, as três metodologias revelaram que, nas condições experimentais empregadas (0,1 mg Al dissolvido.L⁻¹, pH ácido), o metal Al teve um baixo efeito genotóxico para *P. lineatus*. Destaca-se ainda que a técnica de RAPD revelou-se sensível na detecção de alterações sofridas pelo DNA, ainda que estas sejam em pequeno número, mostrando-se uma técnica promissora para estudos de genotoxicidade.

Palavras-chave: alumínio, genotoxicidade, RAPD, ensaio do cometa, micronúcleo, *Prochilodus lineatus*

GALINDO, BRUNO AMBROZIO. Genetic Application of genetic biomarkers to evaluate the genotoxic effects of aluminium in fishes *Prochilodus lineatus*. 2006. Dissertation (Masters in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina – PR.

ABSTRACT

RAPD, comet and micronucleus (MN) assays were used to evaluate the potential genotoxic effects of aluminum in acid water (pH 5) on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Fish were submitted to acute (6h, 24h and 96h) and sub-chronic (15d) exposure of the following treatments: 0.1 mg of dissolved Al.L^{-1} + pH 5 (Al+Ac); pH 5 (Ac); neutral pH (negative-control: NC) and a positive-control (PC). Fish injected with cyclophosphamide at a single dose of 0.04mg.g^{-1} and sampled after 24h were used as positive controls. Before the start of the toxicity tests fish were marked individually and had their fin removed for comparisons of RAPD profiles before and after fish exposure. After treatments both fish gills and liver were used in RAPD analysis. For comet and MN assays peripheral blood were collected from the caudal vein. RAPD analysis revealed differences in RAPD profiles pre (fins) and post exposure (gills and liver) in 14 bands after 6h, 24h and 15 days of Al+Ac and Ac exposure and also in PC. Such alterations might be related to mutations in sites of primers annealing or DNA insertions/deletions. Comet assay showed significant increases in the number of damaged nucleoids and damage score (mean score) between the following treatments: 6h (Al+Ac x CN); 24h (Ac x CN; Ac x Al+Ac) and positive control in relation to all other treatments in all exposure periods. Increases in MN frequency were not observed in any treatment and MN frequencies were kept in basal levels, close to zero, in all animals. Thus, the three methods here applied indicated that in the experimental conditions used (0.1 mg of dissolved Al.L^{-1}) aluminum presented a low genotoxic effect to *P. lineatus*. These results further indicated that RAPD analysis are suitable for the detection of DNA alterations, even if these alterations occur in low number, and represent a promising tool for genotoxic studies.

Key-words: aluminium, genotoxicity, RAPD, comet assay, micronucleus, *Prochilodus lineatus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*..... 38
- Figura 2 Marcação dos peixes com abraçadeira com numeração específica para cada animal..... 40

ARTIGO

- Figura 1 Perfil eletroforético de RAPD obtido com o *primer* OPW4, para indivíduos pertencentes ao grupo experimental Al+Ac do experimento de 24h. A coluna **M** representa o Marcador de 100 pb, as letras **N**, **B** e **F** indicam respectivamente o DNA extraído da nadadeira adiposa, brânquia e fígado de um mesmo indivíduo. A coluna **C** - indica o controle negativo. A seta indica a banda OPW4_767,8..... 65
- Figura 2 Perfil eletroforético das três repetições (Rep 1, Rep 2, Rep 3) de RAPD obtido com o *primer* OPW4, para o indivíduo 33 pertencente ao grupo experimental Al+Ac do experimento de 24h. A coluna **M** representa o Marcador de 100 pb, as letras **N**, **B** e **F** indicam, respectivamente, o DNA extraído da nadadeira adiposa, brânquia e fígado de um mesmo indivíduo. A coluna **C** - indica o controle-negativo. As setas indicam a banda OPW4_767,8 que está presente na nadadeira, porém ausente na brânquia e fígado..... 66
- Figura 3 Escores médios no ensaio do cometa para *P. lineatus* expostos aos diferentes grupos experimentais (controle-negativo, Ac e Al+Ac) sob tratamentos agudos (6h, 24h e 96h) e sub-crônicos (15dias). As barras representam os erros padrão..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Componentes da reação de amplificação do DNA e concentrações utilizadas na reação de RAPD.....	45
----------	--	----

ARTIGO

Tabela 1	Alterações nos padrão de bandas nos perfis de RAPD entre órgãos coletados pré-exposição (nadadeira adiposa [N]) e pós-exposição (brânquia [B] e fígado [F]). A coluna PM indica o peso molecular de cada banda em pares de base (pb). O sinal de + (mais) indica presença da banda e o sinal de – (menos) indica a ausência da banda.....	67
----------	---	----

Tabela 2	Média de nucleóides observados em cada classe de cometa (0, 1, 2, e 3) e média de nucleóides danificados por animal em eritrócitos de <i>P. lineatus</i> expostos a acidez e ao alumínio em pH ácido, considerando-se o número total de animais analisados (N) para cada tratamento experimental e seus controles positivos e negativos.....	69
----------	--	----

Tabela 3	Freqüência média de eritrócitos micronucleados obtidos em <i>P. lineatus</i> após exposições agudas (6, 24 e 96h) e sub-crônica (15 dias) a acidez, alumínio em pH ácido e controle-negativo.....	71
----------	---	----

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica.....	19
2.1 Testes de toxicidade em peixes.....	19
2.2 Metais.....	22
2.3 Genotoxicidade.....	25
2.4 RAPD.....	28
2.5 Teste do Cometa.....	32
2.6 Teste do Micronúcleo.....	34
3. Objetivos.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4. Material e Métodos.....	38
4.1 Espécie estudada.....	38
4.2 Testes de Toxicidade.....	39
4.2.1 Controle Positivo.....	41
4.3 Análise de RAPD.....	42
4.3.1 Extração do DNA genômico.....	42
4.3.2 Quantificação de DNA.....	44
4.3.3 Reações de Amplificação do DNA.....	44
4.3.4 Análise eletroforética.....	46
4.3.5 Análise dos perfis de RAPD.....	47
4.4 Teste do Cometa.....	47
4.5 Teste do Micronúcleo.....	49
4.6 Análise estatística.....	50

ARTIGO

1. Introdução.....	54
2. Materiais e Métodos.....	57
2.1. Espécie estudada	57
2.2. Exposição.....	57
2.3. Amostragens.....	58
2.4. Procedimento de marcação dos animais.....	59
2.5. RAPD.....	59
2.6. Ensaio do cometa e teste do micronúcleo.....	61
2.7. Análise estatística.....	62
3. Resultados.....	64
3.1. Análise de RAPD.....	64
3.2. Teste do cometa.....	68
3.3. Teste do micronúcleo.....	70
4. Discussão.....	72
6. Referências.....	80
6. Conclusões.....	84
Referências Bibliográficas.....	85

1. Introdução

Como consequência do crescimento da população humana e do desenvolvimento industrial, a produção, consumo e descarte de produtos químicos de origem antrópica continua a aumentar. O ambiente aquático é muitas vezes o receptor final desta escala crescente dos contaminantes antrópicos, uma grande proporção dos quais sendo potencialmente genotóxica e carcinogênica (JHA, 2004).

A poluição de ambientes aquáticos é um problema sério e crescente em todo o mundo. Apesar de existir uma legislação de conduta a respeito deste problema em vários países, a poluição aquática por produtos químicos tóxicos ainda ocorre. Organismos aquáticos, como peixes e moluscos, acumulam poluentes diretamente a partir da água contaminada e indiretamente por meio da ingestão de organismos contaminados (VAN DER OOST et al., 2003).

Existem centenas, talvez milhares de poluentes que afetam o ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes. Este número cresce anualmente, considerando que novos compostos e formulações são sintetizados (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Dentre os agentes contaminantes dos ecossistemas aquáticos incluem-se diversos metais, tais como cobre, zinco, cádmio, chumbo e alumínio (Al), de efeito reconhecidamente genotóxico sobre a biota aquática (SANCHEZ-GALAN et al., 1999; MARTINEZ; CÓLUS, 2002; CESTARI et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006). Do conjunto de metais que atingem continuamente os corpos d'água, o alumínio é mencionado como um dos elementos de maior toxicidade em ambientes impactados.

Embora haja na literatura diversos trabalhos que abordem danos causados por metais como cobre, zinco, chumbo, magnésio e alumínio em ambientes aquáticos em regiões temperadas (EXLEY et al., 1996; POLÉO et al., 1997; ALSTAD et al., 2005), ainda são escassas as informações sobre estes metais em ecossistemas aquáticos na região tropical. Outro aspecto importante referente à ação de metais em organismos aquáticos relaciona-se ao fato de que muitos destes se tornam mais facilmente biodisponíveis em ambientes com pH ácido, especialmente em pH inferior a 6,0 (BAKER; SHOFIELD, 1982; STRIPP; TROMBETTA, 1994;). Particularmente, no caso do alumínio, estudos apontam para uma maior disponibilidade e toxicidade deste metal em locais de maior acidez (SPRY; WIENER, 1991; STRIPP; TROMBETTA, 1994). Grande parte dos estudos envolvendo o alumínio investiga os efeitos deste metal sobre aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de organismos aquáticos (KARLSSON-NORRGREN et al., 1986 *apud* STRIPP; TROMBETTA, 1994; STRIPP; TROMBETTA, 1994; BARCAROLLI; MARTINEZ, 2004). Contudo, até o presente, são poucos os relatos sobre os possíveis efeitos genotóxicos do alumínio sobre tais organismos, especialmente em ecossistemas aquáticos tropicais.

Estudos de organismos aquáticos são de suma importância, pois, por estarem em íntimo contato com o meio em que vivem estes podem servir para a análise das condições do ambiente partindo-se de dados a respeito das condições de tais organismos. Para isso pode-se utilizar ferramentas chamadas biomarcadores, que podem ser definidos como alterações biológicas que podem estar relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de

compostos químicos do ambiente (PEAKALL, 1992). Uma destas classes de biomarcadores inclui danos ao DNA como indicador de genotoxicidade.

Entre os diversos organismos que habitam os ambientes aquáticos, os peixes têm se mostrado muito adequados em estudos voltados para as análises de tais ambientes. Os efeitos dos contaminantes em peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica: molecular/bioquímico, genético, celular, fisiológico, morfológico, assim como ao nível da população, comunidade e ecossistema (ADAMS et al., 1990).

Nos bioensaios genéticos, o alvo toxicológico é o DNA, que existe em todas as formas celulares vivas. Assim pode-se extrapolar que compostos reativos com o DNA em uma determinada espécie têm o potencial de produzir efeitos semelhantes em outras espécies (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Ecossistemas resultam da interação entre seres vivos e a matéria inerte onde os seres vivos se aclimatam e adaptam a mudanças ambientais. Estes processos são fisiológicos e possuem uma base genética, por isso o entendimento de mudanças no nível genético (DNA) poderia ajudar a explicar mudanças mais complexas no nível de ecossistemas (SHUGART; THEODORAKIS, 1996).

Nos últimos anos, a técnica de RAPD tem sido utilizada com sucesso para monitorar a presença de efeitos no DNA, incluindo danos ao DNA e potenciais mutações induzidos por diversos agentes genotóxicos (ATIENZAR, 2002b). Outras duas metodologias amplamente empregadas para avaliações genotóxicas e mutagênicas são o Ensaio do Cometa (SCGE, *single cell gel electrophoresis*) e o Teste do Micronúcleo (MN), respectivamente.

Assim, considerando a escassez de estudos que avaliem danos no DNA causados pelo alumínio em peixes neotropicais, bem como a ação deste metal em meios mais ácidos, pretende-se com o este estudo obter informações que ajudem a preencher esta lacuna na literatura. Para tanto, no presente trabalho, as técnicas de RAPD, ensaio do cometa e teste do micronúcleo foram empregadas para avaliar o possível efeito do alumínio (Al) em peixes neotropicais da espécie *Prochilodus lineatus*, expostos a este metal em condições de acidez (pH = 5,0).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Testes de toxicidade em peixes

Estudos ambientais têm mostrado o efeito danoso da introdução de substâncias resultantes de processos antropogênicos no ambiente natural, sejam oriundos de efluentes urbanos, industriais ou da agricultura; em decorrência deste fato, diversos tipos de ensaios genotóxicos tem sido conduzidos em ambientes aquáticos sob estresse antropogênico (LEMOS; TERRA, 2003).

Os efeitos de poluentes ambientais nos organismos podem ser monitorados de diversas maneiras em diferentes níveis. No caso de compostos químicos genotóxicos, os efeitos no DNA podem ser monitorados usando-se vários ensaios como biomarcadores capazes de detectar alterações fenotípicas como resultado de mutação, anormalidades cromossômicas, síntese de DNA não programada, aductos de DNA e quebras no DNA. Técnicas de biologia molecular, tais como DNA *fingerprinting* e amplificação por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) podem revelar diferenças nos marcadores de DNA dos indivíduos de áreas controle e de áreas poluídas (MARTINEZ; CÓLUS, 2002)

A principal característica dos ecossistemas, como por exemplo os aquáticos, é a complexa interação entre fatores físicos, químicos e biológicos, motivo pelo qual se torna necessário conhecer o relacionamento entre os componentes do sistema para compreender sua resposta a uma substância xenobiótica (LEMOS; TERRA, 2003).

Determinar a exposição de espécies no ambiente aquático à agentes genotóxicos é complicado. Existem múltiplos poluentes em potencial, normalmente encontrados em misturas complexas (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Muitas são as variáveis que podem influenciar no contexto aquático e em suas reações com as substâncias xenobióticas. Variáveis ambientais como o potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD), temperatura da água e do ar, transparência, turbidez, salinidade e presença de matéria orgânica, podem interferir nas reações dos agentes tóxicos com o componente biótico e abiótico, influenciando na toxicidez dos compostos químicos. Um dos principais efeitos de baixos valores de pH é o aumento na dissolução de íons metálicos de sua concentração na coluna d'água. A matéria orgânica, que ocorre nas águas naturais, pode interagir com os agentes químicos xenobiontes, influenciando na disponibilidade de produtos tóxicos para a coluna d'água como ocorre com os metais. Por estes motivos os estudos de genotoxicidade ambiental devem considerar e integrar todas estas variáveis (LEMOS; TERRA, 2003).

Uma gama de organismos podem ser usados em avaliações de toxicidade, entre os quais se incluem os peixes. Entre as vantagens na utilização de peixes como organismos-testes estão a facilidade com que eles podem ser mantidos em laboratório e expostos a produtos químicos, e as semelhanças de suas respostas a esses produtos à outros vertebrados superiores, podendo, deste modo, ser usados para projetar a ação desses agentes potencialmente teratogênicos e mutagênicos ao homem. Os peixes são utilizados, principalmente, para a determinação da distribuição e dos

efeitos tóxicos de produtos químicos na contaminação do ambiente aquático. Despejos de esgotos de indústrias e de áreas urbanas são responsáveis pela alta contaminação deste tipo de ambiente (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O uso de espécies nativas para estudos do potencial mutagênico de compostos químicos em peixes é muito importante, pois, além de serem espécies de interesse ecológico, também podem ser fonte de proteína para o homem. Ressalte-se que no Brasil ainda são escassas as pesquisas que utilizam peixes nativos para avaliar efeitos genotóxicos de poluentes aquáticos (na natureza ou em laboratório) (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Para se conhecer o significado dos agentes tóxicos é necessário avaliar a sua biodisponibilidade através de bioensaios (LEMOS; TERRA, 2003). As respostas de animais a diferentes poluentes em testes de laboratório são muito importantes para a comparação com os dados obtidos na natureza (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Apesar de os métodos utilizados pela genética toxicológica na avaliação dos efeitos genotóxicos de agentes químicos em ecossistemas aquáticos estarem aperfeiçoados, normalmente nenhum teste genético, por si só, consegue dar todas as respostas (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

As técnicas empregadas no presente estudo já tiveram sua eficácia comprovada (tanto para estudos de campo, como para estudos de laboratório) em diversos trabalhos que recomendam sua utilização nestes tipo de pesquisa (ATIENZAR et al., 2002a; ATIENZAR et al., 2002b; RODRIGUEZ-CEA et al., 2003; CESTARI et al., 2006; ENAN, 2006; LANKOFF et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2006; UDROIU, 2006).

2.2 Metais

Atualmente diversos trabalhos relatam a presença de poluição por metais nos corpos d'água (YABE; OLIVEIRA, 1998). Dentre os elementos metálicos existentes na natureza os metais pesados constituem um grupo nos quais as massas atômicas são superiores a 40 e são caracterizados por uma distribuição eletrônica similar na sua camada externa. Em ambientes aquáticos, os metais pesados que causam as maiores preocupações são cobre, zinco, cádmio, mercúrio e chumbo. Outros elementos que chamam atenção são alumínio, cromo, prata, arsênico e antimônio, os quais têm contribuído para sérios problemas em ecossistemas de água doce, estuarinos e costeiros (RAND et al., 1995).

O alumínio é um metal leve de número atômico 13 e massa atômica 27, (KANNETH, 2007). É o elemento metálico mais abundante da crosta terrestre, contabilizando aproximadamente 8% da constituição desta, e o terceiro elemento mais abundante, depois do oxigênio e silício. O alumínio está complexado em rochas e minerais, onde os aluminossilicatos e feldspatos predominam. No entanto, a concentração de alumínio na água doce é notavelmente baixa, fazendo deste metal um elemento praticamente excluído da biologia aquática (POLÉO, 1995).

A introdução de metais nos sistemas aquáticos ocorre naturalmente através de processos geoquímicos e do intemperismo, enquanto a contribuição atribuída à atividade humana é um reflexo de sua ampla utilização pela indústria (YABE; OLIVEIRA, 1998). Estes mesmos autores, em um estudo realizado em um ribeirão urbano, encontraram concentrações elevadas de

vários metais, entre eles o alumínio que apareceu em uma concentração total de 0,46 mg.L⁻¹.

Como destacado anteriormente, o alumínio é reconhecido como um dos elementos de maior toxicidade em corpos de água impactados e acentuadamente tóxico para os peixes (POLÉO, 1995). Essa toxicidade está relacionada com uma série de fatores, como a temperatura, a dureza da água e a própria forma do alumínio no meio (livre, ligado ou quelado). Embora esses fatores contribuam para o aumento da toxicidade do alumínio, considera-se que o valor do pH da água tenha maior relevância, pois o alumínio apresenta grande solubilidade em baixos níveis de pH (GIL et al., 1993). Tem sido constatado que monômeros de íons hidróxi são primariamente responsáveis pela toxicidade aquática do alumínio (WAUER, 2004).

Em um trabalho realizado por Lankoff et al. (2006) com linfócitos humanos, o alumínio revelou-se como um agente com propriedades citotóxicas e genotóxicas, além de um indutor de danos oxidativos ao DNA. Neste mesmo trabalho verificou-se que a exposição ao alumínio pode causar um atraso no ciclo celular. Também foi detectado que o alumínio inibe o reparo de danos ao DNA induzidos por radiação.

Poléo et al. (1997), em um trabalho realizado com sete espécies de peixes de água doce, confirma o resultado obtido em pesquisas anteriores nas quais o alumínio mostrou-se tóxico para espécies de peixes de água doce em testes agudos, bem como o principal agente tóxico causador da morte de peixes em águas ácidas. Neste estudo, este autor constata uma mortalidade maior para os peixes submetidos à condição de pH ácido e água rica em

alumínio, do que para os peixes submetidos ao pH ácido, porém em água com baixa concentração em alumínio, ou para o grupo controle.

Estudos de mutagenicidade com espécies nativas de peixes são importantes na determinação dos efeitos potenciais de agentes tóxicos sobre a ictiofauna (MATSUMOTO; CÓLUS, 2000). Apesar disto, no Brasil, ainda são poucas as espécies nativas de peixes que têm sido usadas em testes de toxicidade aguda e crônica. Em um trabalho recente realizado com uma espécie de peixe neotropical, Cestari et al. (2004) ao investigar os efeitos de metais pesados sob o DNA dos indivíduos, sugerem que os danos genéticos observados ilustram a necessidade de investigar o efeito potencial de metais pesados em espécies de peixes da América do Sul.

Em um outro trabalho realizado em um lago urbano no município de Londrina, Lemos et al. (2005) sugerem que os metais chumbo e alumínio, encontrados no lago em concentrações elevadas, seriam possíveis agentes responsáveis pelos danos no DNA detectados pelo teste do cometa. De acordo com a resolução CONAMA 357 (2005) a quantidade limite de alumínio dissolvido permitida para rios e lagos é de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Diferentes mecanismos de toxicidade aguda para o alumínio têm sido descritos por diversos autores:

- Precipitação do $\text{Al}(\text{OH})_3$ na superfície branquial, agindo como uma barreira para a troca gasosa e pode causar asfixia em peixes expostos. (BAKER; SCHOFIELD, 1982).
- Exley et al. (1991) propuseram o mecanismo bipartido: primeiramente os íons $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ ligam-se na superfície branquial, prejudicando as propriedades de barreira do epitélio branquial. O qual permite a

internalização celular na matriz de muco que reveste o epitélio brânquia. A subsequente disfunção iônica e osmorregulatória resultam em uma necrose celular acelerada, degradação e morte das células.

- Sob certas condições (pH acima de 5 ou após um aumento no pH) durante polimerização do alumínio os sítios carregados negativamente nas brânquias podem agir como núcleos de polimerização deste metal. O efeito primário foi a obstrução de regiões da brânquia seguida pela redução do fluxo de água entre as superfícies respiratórias, e um aumento na espessura da barreira de difusão de gases e íons. Como consequência tem-se um aumento na ventilação e no transporte ativo, neutralizando a perda de íons, por fim, levando a hipóxia (POLÉO, 1995)
- Contrário ao item anterior, a toxicidade do alumínio foi constatada ser mais aguda no pH 6,5, e nem sempre associada com o alumínio precipitado na superfície branquial, e sim com a força de ligação do alumínio como sendo o fator determinante. Estes resultados sustentam a hipótese do mecanismo de toxicidade no qual pequenos polímeros neutros de hidróxido de alumínio atravessam a camada de muco na superfície branquial e induzem a uma asfixia fatal (EXLEY et al., 1996).

2.3 Genotoxicidade

Genética toxicológica é a área da ciência na qual a interação entre o DNA e os agentes danosos a esta molécula é estudada em relação aos efeitos subsequentes na saúde dos organismos (SHUGART, 1995).

Assim, agentes que produzem alterações nos ácidos nucleicos em exposições a concentrações subletais, resultando em mudanças nas características hereditárias, ou aparecimento de novidades no DNA, são classificados como genotóxicos (SHUGART, 1995). Segundo este autor, o termo genotóxico é geralmente usado para descrever e distinguir agentes químicos (e físicos) que têm uma afinidade para uma interação direta com o DNA daqueles que não interagem.

Poluentes genotóxicos agem diretamente na estrutura e função do DNA. Atualmente, alterações no DNA podem ser detectadas por um grande número de técnicas laboratoriais. Para o monitoramento genotóxico, tecnologias moleculares facilitaram o entendimento dos mecanismos envolvidos em danos genéticos e permitem a avaliação de uma ampla escala dos efeitos no DNA das espécies expostas (CASTAÑO; BECERRIL, 2004).

Danos ao DNA podem ocorrer como resultado do desgaste por eventos celulares normais, tal como metabolismo e cinética das moléculas ao acaso, interações com agentes físicos como luz ultravioleta e radiações ionizantes, e interações com agentes químicos. Estes vários processos originam alterações estruturais, as quais são usualmente reparadas rapidamente; entretanto, neste processo de reparo há produção de uma população transitória de DNA com um aumento nas quebras de filamentos e, deste modo, de um polímero de baixa integridade. Alguns agentes químicos exercem seu efeito via mecanismo de radicais livres e causam quebras no DNA diretamente, enquanto que outros agentes genotóxicos podem interferir na fidelidade do reparo de DNA ou modificações normais no DNA. Perdas espontâneas de bases da molécula de DNA (sítios abásicos) são lesões freqüentes que ocorrem como resultado da

cinética química casual das moléculas ou decomposição de aductos quimicamente instáveis. Mesmo o processo celular normal de replicação produz DNA com quebras de filamento. Por esta razão a qualquer momento o nível basal de DNA com baixa integridade (DNA com vários tipos de alterações estruturais) pode existir na célula (SHUGART, 1995).

Muitos tipos de processos enzimáticos de reparo de DNA surgiram durante o processo de evolução para manter a fidelidade e integridade da informação genética. O DNA é a única molécula com capacidade de se auto-reparar. Uma característica comum do reparo é a habilidade de remover e substituir segmentos danificados do DNA. Por esta razão se uma lesão no DNA induzida por um mutágeno pode ser reparada antes da fixação, pode não haver efeito sob DNA que sofreu dano (SHUGART, 1995).

Quando um organismo é exposto à poluição química, uma série de eventos pode ser iniciada, os quais podem resultar no aparecimento de sintomas de toxicidade. Logo após a interação inicial do poluente com o organismo, um número de alterações bioquímicas e fisiológicas ocorre, as quais afetam primeiramente o indivíduo e subseqüentemente a população e a comunidade como um todo (SAVVA, 2000).

Tendo em vista que a exposição genotóxica pode atuar como uma força seletiva por eliminar genótipos susceptíveis, ou reduzir o número de descendentes que contribuiriam para a próxima geração, o resultado pode ser a redução na variabilidade genérica total dentro de uma população ou uma mudança na freqüência genotípica (SHUGART; THEODORAKIS, 1996). Conseqüentemente, nos últimos anos a genotoxicidade de vários compostos químicos com uma abordagem ambiental tem sido alvo de muitos estudos

(SHUGART; THEODORAKIS, 1996; CLAXTON et al., 1998; KLEINJANS; SCHOOTEN, 2002; JHA, 2004).

2.4 RAPD

O RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificado ao Acaso) é uma variação da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) desenvolvida simultaneamente por Williams et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990) com duas características distintivas: utiliza um *primer* único ao invés de um par de *primers* e estes são curtos com aproximadamente 10 nucleotídeos e de seqüência arbitrária.

A metodologia de RAPD tem sido muito utilizada em trabalhos que visam detectar o dano de vários produtos químicos no DNA (FERRERO et al., 1998; ATIENZAR et al., 1998; THEODORAKIS; BICKHAM, 2004; ATIENZAR; JHA, 2004; ZHIYI; HAOWEN, 2004; LIU et al., 2005).

De acordo com alguns autores, danos ao DNA genômico promovem mudanças nos sítios de anelamento dos *primers*, alterando o produto da PCR, isso leva a uma mudança no padrão de bandas na eletroforese (SAVVA, 1998; BECERRIL et al., 1999; ZHIYI; HAOWEN, 2004), tornando esta técnica molecular bastante adequada para a detecção da genotoxicidade de poluentes (ATIENZAR et al., 2000). Atualmente, muitos trabalhos têm concluído que a técnica de RAPD pode ser usada como uma valiosa ferramenta para detectar danos no DNA, causados pelos mais diversos fatores (BECERRIL et al., 1999; ATIENZAR et al., 2000; ZHIYI; HAOWEN, 2004).

Novos produtos de PCR podem ser amplificados porque alguns sítios tornam-se acessíveis aos *primers* depois de mudanças estruturais, ou porque algumas mutações ocorreram no genoma. A perda de um fragmento amplificado poderá se dar se algumas alterações estruturais ocorrerem em 70 a 90% das células, ou se algumas mutações surgirem na mesma porcentagem das células (ATIENZAR, 2000 *apud* ENAN, 2006). Entretanto, é muito improvável que mutações ocorram em um grande número de células, porque a maioria dos danos ao DNA, os quais podem levar a mutações durante a replicação do DNA, é eficientemente reparada (ENAN, 2006). Ainda segundo este autor, lesões no DNA, tais como aductos, são esperadas causar efeitos danosos aos perfis de RAPD. Estas não somente podem causar alterações estruturais, mas também podem reduzir a polimerização do DNA e/ou bloquear a Taq DNA polimerase (WHITE, 1990 *apud* ENAN, 2006), resultando em um decréscimo na intensidade das bandas, ou alternativamente, no desaparecimento de produtos de amplificação, em casos de danos extensivos no DNA (DeWOLF et al., 2004).

Quando um animal é exposto a um agente genotóxico é muito provável que apenas algumas células sejam afetadas, além disto, mesmo nas células afetadas, o agente poderia afetar diferentes sítios em diferentes cromossomos. Visto que em uma amostra de DNA o DNA poderia ser originado de centenas ou milhares de células, parece improvável que todo o DNA seria danificado nos mesmos sítios. Conseqüentemente, os resultados destes estudos mostram-se paradoxais. Uma explicação muito plausível é que isto pode ser relacionado à cinética da PCR. Como a força de ligação do *primer* para diferentes sítios de ligação de *primers* é quase certamente diferente, não é exagerado assumir que

sítios alterados podem ter alta afinidade pelo *primer*, resultando em uma ligação preferencial deste aos sítios que são, então, amplificados (SAVVA, 2000). Deste modo, um evento pode resultar em diferenças nos *fingerprintings* mesmo naqueles casos em que o DNA alterado representa uma pequena proporção do DNA total (SAVVA, 2000).

Outra explicação alternativa pode ser relacionada aos processos de mutagênese e reparo, resultando em *hotspots* de mutações localizadas; estudos indicam que as mutações não são, necessariamente, eventos totalmente aleatórios (SAVVA, 2000). Assim, mudanças nos perfis de RAPD ocorreriam somente quando *hotspots* de mutações aparecessem em um número mínimo de células (limiar de detecção). Esta afirmação poderia também ser aplicada à detecção de danos ao DNA. Por outro lado, a mudança de uma única base na seqüência de um *primer* de 10 nucleotídeos, na maioria dos casos causa mudanças substanciais nos perfis de RAPD (ATIENZAR, 2002a).

Modificações nos padrões de RAPD são provavelmente devidos a um ou uma combinação dos seguintes eventos: (1) alterações nos oligonucleotídeos dos sítios de anelamento dos *primers* devido, principalmente, a rearranjos genômicos e menos provavelmente devido danos ao DNA e mutações de ponto no sítio de ligação do *primer* (porque o sítio de ligação de *primer* tem apenas 10 bases de extensão, enquanto rearranjos genômicos ocorrem em fragmentos muito maiores (vários Kb); (2) alterações estruturais devido a danos no DNA tal como aductos, sendo estes muito mais importantes que as mutações de ponto; e (3) interações com a DNA polimerase com o DNA danificado (ATIENZAR et al., 1999).

Atienzar et al. (2000) sugerem que a técnica de RAPD seja aplicada em conjunto com outros biomarcadores aplicados em outros níveis de organização biológica, assim, seria uma poderosa ferramenta para estudos em ecotoxicologia.

Vale a pena ressaltar algumas vantagens da técnica de RAPD como: a necessidade de pequenas quantidades de DNA, a utilização de um único *primer* de aproximadamente 10 nucleotídeos com uma seqüência arbitrária, dispensando o conhecimento prévio do genoma ou de parte do genoma do indivíduo, aplicabilidade a várias classes de seres vivos e abrangência de várias regiões do genoma (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al. 1990).

No caso de aplicação desta técnica para estudos genotóxicos, Atienzar (2002a) também resalta que as principais vantagens do RAPD estão na sua rapidez, aplicabilidade a diversos organismos (não exigindo conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos, ciclo celular ou complemento cromossômico), sem a necessidade de informações prévias da seqüência de nucleotídeos e um destacado potencial de detectar danos ao DNA e mutações em um amplo espectro de danos ao DNA.

Segundo Enan (2006) a técnica de RAPD é claramente promissora na detecção de efeitos de poluentes ao DNA. Por exemplo, uma bateria de experimentos realizados *in vitro* revelou que alterações no DNA como, quebras no DNA, aductos de benzo(a)pyrene e dímeros de timina bem como mutações na seqüência do *primer* induzem alterações significativas nos perfis de RAPD (ATIENZAR, 2000). Porém, o teste de RAPD somente permite um acesso qualitativo aos efeitos no DNA, e a natureza das alterações nos perfis pode

somente ser especulada a não ser que os fragmentos amplificados sejam analisados por seqüenciamento, utilização de sondas entre outros (ATIENZAR, 2002b).

2.5 Teste do Cometa

Outra técnica muito utilizada em testes de genotoxicidade é o teste do cometa, um método muito sensível, rápido e econômico para a detecção de danos no DNA (TICE et al., 1990). Este teste demonstrado ser uma técnica útil para avaliação de danos ao DNA entre uma variedade de tipos celulares, nas quais os danos podem ser induzidos por vários agentes químicos e físicos. Em comparação com outros métodos sensíveis, o teste do cometa é relativamente robusto e econômico (ROJAS et al, 1999).

Nas últimas décadas, uma série de estudos tem comprovado a eficiência deste teste em avaliações de genotoxicidade (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; TICE et al., 2000; LEE; STEINERT, 2003; LEMOS et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006).

O teste do cometa se baseia na detecção, sob condições alcalinas, de fragmentos de DNA, que na eletroforese migram do core nuclear muito mais rapidamente do que o DNA intacto, resultando na formação de um cometa com cauda (TICE et al., 1990). A técnica consiste, inicialmente, na disposição de uma suspensão de células embebidas em gel de agarose sobre a superfície de uma lâmina. Em seguida, as lâminas são transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes afim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente, as lâminas

são imersas em um tampão de pH variável de acordo com a versão do teste empregado. Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundária e terciária presentes no núcleo celular. Imediatamente ao desenovelamento, as lâminas são submetidas a uma corrente elétrica de modo a induzir a migração dos fragmentos de DNA no sentido da corrente elétrica (VILLELA et al., 2003).

Segundo Mitchelmore e Chipman (1998), o ensaio do cometa é uma técnica, sensível, rápida e econômica para detecção de quebra do filamento de DNA (simples e dupla), a qual é aplicada de maneira ideal como um biomarcador de genotoxicidade não específico em peixes ou outras espécies aquáticas.

São diversas as aplicações potenciais do teste do cometa dentro da biologia, incluindo estudos de genotoxicidade clínica, monitoramento ambiental entre outros (ROJAS et al., 1999). Fazendo uso desta técnica, Lankoff et al. (2006) detectaram, em cultura de células de linfócitos, os potenciais citotóxico e genotóxico do alumínio.

Vários trabalhos têm utilizado o teste do cometa em peixes para detectar o potencial de alguns metais em causar danos ao DNA. Em um trabalho realizado em um lago urbano no município de Londrina, Lemos et al. (2005) sugerem que os metais chumbo e alumínio encontrados em concentrações elevadas no lago estudado seriam os possíveis agentes responsáveis pelos danos no DNA detectados pelo teste do cometa. Cestari et al. (2004) detectaram, por meio desta técnica, danos ao DNA causados por chumbo em uma espécie de peixe neotropical, sugerindo que esta técnica é útil e pode ser aplicada para avaliar os danos causados por metais pesados em peixes.

Matsumoto et al. (2006) também detectaram através do teste do cometa danos ao DNA de peixes expostos a efluentes de curtume ricos em cromo.

2.6 Teste do Micronúcleo

Micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos de cromossomos. Mas, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode constituir um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (MARTINEZ; CÓLUS, 2002; VILLELA et al., 2003). Assim, micronúcleos surgem quando um cromossomo inteiro ou um fragmento de um cromossomo não migra para um dos dois núcleos filhos formados durante a divisão celular. O primeiro caso (perda cromossômica) é devido a um evento aneugênico relacionado ao aparato do fuso, enquanto o segundo, após uma quebra cromossômica, é decorrente de um evento clastogênico (UDROIU, 2006).

Os micronúcleos são, estruturalmente, pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos). O teste do micronúcleo, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese,

aneugênese e danos no fuso mitótico (VILLELA et al., 2003). Contudo, para que o MN seja visualizado é necessária uma divisão celular após o evento mutagênico, por isso, ou precisa-se fazer cultivo celular, ou usar células que estão se multiplicando constantemente, como medula óssea.

Segundo Bolognesi et al. (2006) o teste do MN tem a vantagem de poder ser aplicado na interfase de qualquer população celular em proliferação, independentemente do seu cariótipo. Assim, vários tecidos têm sido usados para realização do teste do micronúcleo, tais como brânquia e fígado. Porém, ainda segundo o mesmo autor, o uso de eritrócitos periféricos evita procedimentos complexos associados com preparações celulares e sacrifício dos animais. Adicionalmente, a alta taxa mitótica de tecidos hematopoiéticos fornece uma resposta rápida a exposição genotóxica, revelando os danos cromossômicos em sangue periférico.

O teste do micronúcleo tem sido amplamente utilizado para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos. Entretanto, uma grande parte dos trabalhos publicados até agora realizaram este teste com espécies de mamíferos (especialmente roedores), embora o teste do micronúcleo seja uma ferramenta útil também com amostras obtidas de outros animais que não mamíferos. Em particular, esta técnica tem permitido detectar as propriedades genotóxicas de componentes presentes no ambiente aquático (UDROIU, 2006). De acordo com este autor, como os peixes aparentam responder aos xenobióticos da mesma forma que os mamíferos, eles podem ser usados para testar as possíveis propriedades genotóxicas de agentes químicos e físicos. De fato, o teste do micronúcleo em peixes tem mostrado ser

útil em técnicas *in vivo* para testar a mutagenicidade, e mostra potencial para monitoramento *in situ* da qualidade da água (AL-SABIT; METCALFE, 1995).

Martinez e Cólus (2002) empregaram este teste para a avaliação do efeito de diferentes poluentes em algumas espécies de peixes neotropicais, encontrando um aumento na frequência de micronúcleos para substâncias como herbicidas, inseticidas e metais como chumbo e alumínio.

Rodriguez-Cea et al. (2003) demonstram a utilidade do teste do micronúcleo em espécies de peixes, tanto para estudos de campo como para estudos de laboratório.

Em outros trabalhos também utilizando a técnica do MN em estudos com peixes foram relatados o aumento nas frequências de micronúcleos para compostos como efluentes industriais, metais e agentes reconhecidamente mutagênicos (SANCHEZ-GALAN et al., 1999; RODRIGUEZ-CEA et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2006).

Entretanto, o mecanismo pelo qual os poluentes induzem micronúcleos em células de peixes, bem como o mecanismo do efeito interativo entre poluentes e células de peixes não estão totalmente entendidos. É provável que muitos agentes não genotóxicos que resultam em uma resposta positiva com a produção de MN em peixes, como o metil mercúrio, PCBs e DDT, induzem micronúcleos através da inativação das fibras do fuso (AL-SABIT; METCALFE, 1995).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Investigar possíveis efeitos genotóxicos em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos em ensaios agudos e sub-crônico com o metal alumínio em pH ácido.

3.2 Objetivos específicos

- Aplicar a técnica de RAPD, ensaio do cometa e teste do micronúcleo para avaliar os danos ocorridos no DNA de peixes submetidos ao estresse agudo e sub-crônico com o alumínio em meio ácido (pH = 5,0).
- Comparar, por meio de marcadores RAPD, possíveis alterações nos perfis eletroforéticos de brânquia e fígado, dois órgãos-alvos de agentes estressores, quanto aos possíveis danos sofridos pelo DNA em peixes expostos a diferentes tratamentos e tempos de exposição.
- Avaliar a utilização da técnica de RAPD para a detecção de biomarcadores genéticos capazes de fornecer informações para o monitoramento de corpos d'água que apresentam concentrações elevadas de alumínio.

4. Material e Métodos

4.1 Espécie estudada

No presente estudo foram utilizados espécimes de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) (= *P. scrofa* Steindachner, 1881), uma espécie de peixe neotropical, popularmente conhecida como curimba, pertencente à família Prochilodontidae, Ordem Characiformes e Superordem Ostariophysi (Figura 1).

Por apresentarem hábito alimentar detritívoro os peixes desta espécie podem entrar em contato com xenobióticos presentes tanto no sedimento quanto na água e como consequência deste fato, *P. lineatus* tem se mostrado sensível a substâncias tóxicas do meio (MARTINEZ; CÓLUS, 2002; MARTINEZ et al., 2004; SIMONATO et al., 2006), sendo considerado um biodiagnóstico vertebrado potencial para o monitoramento ambiental (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).



Figura 1 - Exemplo jovem de *Prochilodus lineatus*.

4.2 Testes de Toxicidade

Nos experimentos foram usados exemplares juvenis de *P. lineatus* fornecidos pela Estação de Piscicultura da UEL (EPUEL), mantidos em aclimatação, por pelo menos uma semana antes dos experimentos, em tanques de 600 L com água continuamente aerada (temperatura em torno de 20° C, pH em torno de 7,0), com fotoperíodo de 14 h de escuro e 10 h de luz. Os animais foram alimentados com ração apropriada a cada 48 horas, exceto durante e no dia anterior aos testes.

Foram realizados três tipos de experimentos, do tipo estático: pH 7,0 + 0 mg Al.L⁻¹ (grupo controle-negativo), pH 5,0 + 0 mg Al.L⁻¹ (grupo acidez) e pH 5,0 + 0,1 mg Al.L⁻¹ (grupo Al + acidez). Durante os experimentos foram realizados dois tipos de ensaios: agudos, com amostragens nos tempos de 6h, 24 h, 96 h; e sub-crônico, com duração de 15 dias. Em cada tratamento foram mantidos seis peixes em aquários de 100 L, com réplicas para o tratamento do grupo Al + acidez (Al + Ac). Nos tratamentos de acidez (Ac) o pH da água foi reduzido a 5,0 pela adição de HCl 50%, sendo monitorado a cada 6 horas para a manutenção de forma constante do pH no valor de 5,0. O Al foi adicionado à água na forma de Al₂(SO₄)₃ e a concentração de alumínio utilizada foi de 0,1 mg Al.L⁻¹ (= 0,1 ppm), a qual constitui a concentração limite permitida pela resolução CONAMA no. 357/2005.

No experimento de 15 dias, a concentração de alumínio utilizada foi a de 0,05 mg Al.L⁻¹ (= 0,05 ppm), já que em experimentos anteriores, com a concentração de 0,1 mg Al.L⁻¹ os animais não sobreviveram durante todo o período experimental. Ainda durante este experimento, metade da água dos

aquários foi renovada a cada 5 dias (120h) e a cada renovação a quantidade de alumínio correspondente a metade da dose inicial foi repostada, visando manter inalterada a concentração de alumínio.

Anteriormente ao período de aclimação, os peixes foram anestesiados para a retirada da nadadeira adiposa e marcação dos indivíduos com uma abraçadeira de plástico branco com numeração específica para cada indivíduo (Figura 2). A marcação dos peixes foi feita para a identificação dos diferentes indivíduos e posterior comparação dos perfis de RAPD dos animais pré e pós-exposição ao tratamento. Após a marcação, os peixes foram submetidos a um “banho de sal”, onde os animais permaneciam em uma solução de NaCl (15g/L) por aproximadamente 15 segundos, com a finalidade de eliminar qualquer microrganismo que pudesse se prejudicial a saúde dos animais.



Figura 2 – Marcação dos peixes com abraçadeira com numeração específica para cada animal.

Imediatamente após a retirada do peixe da água, este foi anestesiado com benzocaína, na concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, até a perda do equilíbrio. Em seguida foram retiradas amostras de sangue através da veia caudal com o auxílio de seringas heparinizadas e estas amostras de sangue foram divididas em duas alíquotas para a utilização nos testes do cometa e do micronúcleo. Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por secção medular para a retirada das brânquias e dos fígados.

4.2.1 Controle Positivo

Para realização dos ensaios de controle-positivo foram tomados os mesmos cuidados de aclimatação já descritos no item acima. Foram utilizados 8 exemplares de *P. lineatus* que foram igualmente anestesiados, marcados e tiveram a nadadeira adiposa retirada. Ainda anestesiados os animais receberam uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (0,04 mg de ciclofosfamida / g de animal). Os animais foram mantidos em aquários durante 24h, nas mesmas condições dos grupos experimentais. Ao final deste período foram realizadas as amostragens como já descrito no item anterior.

4.3 Análise de RAPD

4.3.1 Extração do DNA genômico

Para as análises de RAPD, o DNA foi extraído de três tipos de tecidos: nadadeira adiposa, brânquia e o fígado. Como mencionado, a nadadeira adiposa, retirada antes do período experimental, forneceu o perfil de RAPD pré-exposição, enquanto a brânquia e o fígado, amostrados após o período experimental, forneceram os perfis de RAPD pós-exposição. A escolha da brânquia e do fígado foi feita com base, respectivamente, na exposição e função destes órgãos, que tornam as células de ambos potencialmente sujeitas a danos no material genético.

Para as extrações de DNA das brânquias foi utilizada uma metodologia para diminuir a quantidade de muco neste tecido. As brânquias permaneceram submersas em etanol 100% por 24 horas, mantidas sob refrigeração de 5°C, o álcool foi trocado a cada 6 horas. Após este período, as brânquias foram lavadas três vezes com água ultrapura.

A extração do DNA foi baseada na metodologia descrita por Almeida et al. (2001). Nas extrações, as amostras de tecido foram dilaceradas com o auxílio de uma tesoura e, em seguida, transferidas para microtubos de 2 mL contendo aproximadamente o mesmo volume de tampão de extração 9 (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 1%), onde foram adicionados 5µL de Proteinase K (20 mg de Proteinase K em 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, acetato de cálcio 3mM pH 8,0). Após homogeneização, estes tubos foram mantidos em banho-maria a 64°C por 24h ou até a dissolução total

do tecido. Durante este período os microtubos foram invertidos periodicamente para uma melhor homogeneização da mistura, podendo assim o tecido ser digerido por inteiro. Ao fim deste período foi adicionado ao tubo o mesmo volume de tampão fenol, com subsequente homogeneização do material. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7280 g por 13 minutos. Feito isto, foi retirada a fase superior (sobrenadante) com o auxílio de uma micropipeta e colocada em um novo microtubo, ao qual foi acrescentado o mesmo volume de Clorofane (1 Fenol : 1 Clorofil). Novamente os microtubos foram homogeneizados por inversão e, centrifugados a 7280 g por 13 minutos. Ao término desta centrifugação o sobrenadante foi novamente retirado e transferido para outro microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de Clorofil (Clorofórmio 24:1 álcool isoamílico); em seguida, os tubos foram mais uma vez homogeneizados e então centrifugados a 7280 g por 13 minutos. Após a retirada da fase aquosa, esta foi transferida para outro microtubo no qual foram adicionados 10% do volume do sobrenadante de NaCl 3M, e 250% do volume de etanol absoluto (-20°C), para que a precipitação do DNA. Após a precipitação os tubos foram centrifugados a 10483 g durante 15 minutos. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o corpo de fundo (*pellet*) foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado a 10483 g durante 10 minutos. Após esta centrifugação o corpo de fundo (*pellet*) foi posto para secar. Ao final, o mesmo foi solubilizado em 150 µL de TE (10mM Tris; 1 mM EDTA pH8,0).

4.3.2 Quantificação de DNA

Para a quantificação, as amostras foram diluídas dez vezes em tampão TE e quantificadas em Fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer). Para calibrar o equipamento foi utilizado o DNA padrão *Calf Thymus* – Pharmacia Biotech (1:10 do estoque $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a solução padrão para dosagem composta por $0,1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ DQ 201 Hoechst 33258 Fluorescent Dye (Pharmacia Biotech) e TNE 10x (100 mM Tris; 10 mM EDTA; 2M NaCl). O equipamento foi calibrado em $100\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para se realizar as leituras das amostras, bem como para zerar o fluorímetro, foi utilizado o protocolo proposto pelo fabricante. Para cada amostra foram feitas duas leituras e em seguida foi feita uma média aritmética de ambos os valores obtidos. A partir desta média, que fornece a concentração das amostras em $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, foram feitos cálculos de diluição para que as amostras ficassem a uma concentração de $2\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

4.3.3 Reações de Amplificação do DNA

As reações de amplificação foram baseadas na metodologia proposta por Williams et al. (1990), com algumas modificações. Foram utilizadas reações de $15\ \mu\text{L}$ contendo: tampão (10mM Tris-HCl pH 8,3 / 50mM KCl); dNTP (Pharmacia - $250\ \mu\text{M}$); *primer* (Operon Technologies - $0,33\ \mu\text{M}$); MgCl_2 (3,3 mM); DNA polimerase (1U); DNA genômico ($4 - 15\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e água estéril q.s.p. (Tabela 1).

Tabela 1 - Componentes da reação de amplificação do DNA e concentrações utilizadas na reação de RAPD.

Componentes	Concentração Estoque	Volume na Reação (μL)	Concentração Final
Água Estéril	-----	2,8	Qsp
Tampão	10x	1,5	1x
dNTP	2,5 mM	1,5	250 μM
MgCl ₂	10 mM	5,0	3,3 mM
<i>Primer</i>	2,5 μM	2,0	0,33 μM
DNA Polimerase	5U/ μL	0,2	1 U
DNA	2-10ng/ μL	2,0	4 - 20 ng
TOTAL	-	15,0	-

Para a amplificação do DNA foi utilizado um termocilcador (PTC-100, MJ Research, Inc.) programado para realizar 40 ciclos após desnaturação inicial de 4 minutos a 92°C. Cada ciclo foi constituído de três fases, sendo elas: desnaturação, pareamento (anelamento) e extensão. A fase de desnaturação tem duração de 40 segundos, com a temperatura sendo mantida em 92°C; a fase de pareamento com duração de 1 minuto e meio e temperatura de 40°C; por fim, a fase de extensão com duração de 2 min e temperatura em 72°C. Após os 40 ciclos segue-se ainda uma fase de extensão final na qual a temperatura é mantida em 72°C durante 5 minutos.

Para a amplificação das amostras foi feita uma seleção de *primers* de kits comerciais (Operon Technologies, Inc.).

4.3.4 Análise eletroforética

Terminadas as amplificações, a cada amostra de 15 μL foram adicionados 4 μL de tampão de amostra Ficoll 5x (0,25 mL de azul de bromofenol, 15 g Ficoll em um volume total de 100 mL de água ultrapura Qsp). Em seguida, 18 μL desta amostra foram aplicados em géis de agarose 1,4%. Juntamente com as amostras foi também aplicado no gel um marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Amersham Biosciences) (10 μL de marcador, 20 μL tampão de amostra 6X e 80 μL de TE) para a estimativa dos pesos moleculares das diferentes bandas, os quais foram, posteriormente, calculados com o auxílio do programa computacional *Fragment Length Calculator* 3.5.0. Os géis foram submetidos à eletroforese à $3\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ e uma corrida de 10 cm. Tanto o tampão utilizado na cuba de eletroforese, como o utilizado para polimerizar o gel foi o TBE 0,5x, diluído a partir da solução TBE 10x (Tris 0,89M; ácido bórico 0,89 M e EDTA 0,02 M pH 8,3). Após o término da eletroforese os géis foram corados em solução de brometo de etídio (20 μL de brometo de etídio/100mL de TBE). Depois de corados, os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados por meio do sistema de digitalização Kodak EDAS 290.

4.3.5 Análise dos perfis de RAPD

As análises de RAPD foram feitas com base nos três perfis de RAPD obtidos para cada animal e, incluíram uma comparação entre os perfis obtidos das ampliações das amostras extraídas da nadadeira (pré-exposição) e os perfis eletroforéticos obtidos das ampliações das amostras das brânquias e do fígado (pós-exposição) dos peixes.

Quando constatada alteração no perfil eletroforético de algum indivíduo, foram realizadas três repetições das reações de RAPD para verificar a consistência do resultado. Confirmada a alteração foram calculados os pesos moleculares das bandas que surgiram ou desapareceram.

4.4 Teste do Cometa

A metodologia para o teste do cometa foi baseada no protocolo descrito por Singh et al. (1988). Uma alíquota de 10 μ L de sangue foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo solução salina apropriada (17 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,5 mM CaCl, 1,2 mM NaHCO₃, 4,5 mM Na₂HPO₄, 2,9 mM NaH₂PO₄) e mantido em gelo, até o momento de se realizar o ensaio. Da suspensão de eritrócitos apropriada, 15 μ L foram misturados com 120 μ L de agarose 0,5% de baixo ponto de fusão (37°C). Desta suspensão, 135 μ L foram pipetados sobre duas lâminas de vidro geladas e previamente cobertas com uma camada de agarose 1,5% ponto de fusão normal, e cobertos com lamínula. A lâminas em seguida foram acondicionadas em refrigerador (4°C)

por aproximadamente 20 minutos para permitir a completa solidificação da agarose.

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi removida e a lâmina foi colocada numa solução de lise recém preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, Triton X-100 1%), pH 10,0 e incubada em refrigerador (4°C) por pelo menos 1 hora. Após a lise, a lâmina foi colocada numa cuba de eletroforese horizontal. Tampão recém preparado (0,3 N NaOH / 1 mM EDTA) foi adicionado à cuba e a lâmina submersa no tampão alcalino por 20 minutos.

A lâmina foi exposta por 20 min a 3°C às condições de eletroforese: 25V, com a corrente elétrica ajustada para 300 mA através da alteração lenta do nível de tampão da cuba. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas utilizando tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 min. Este passo foi repetido 3 vezes. Então as lâminas foram fixadas em etanol 100% por 10 minutos. Por fim as lâminas foram secas e acondicionadas em refrigerador até o momento das análises. No momento das análises as lâminas foram coradas com 90µL uma solução de brometo de etídeo (0,02 mg/mL).

As lâminas foram, então, examinadas ao microscópio de fluorescência no aumento de 1000X, equipado com um filtro de excitação de 515-560 nm de comprimento de onda e um filtro de barreira para 590 nm. Todas as lâminas foram codificadas e examinadas em teste cego. Foram examinadas 100 nucleóides por animal. As células analisadas receberam escores de acordo com a classe de dano (0: sem dano, 1: com dano mínimo, 2: com dano médio, 3: com dano máximo) segundo Kobayashi et al. (1995). Em seguida foi calculado o escore médio multiplicando-se o número de células obtidas em cada classe pelo valor da classe, de acordo com a fórmula abaixo:

Escore: $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$, onde: A, B, C e D são os números de células encontradas para cada categoria de dano. Assim, o escore total para as células analisadas deve variar de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 300 (dano máximo = todas as células possuem dano de classe 3).

Foi também calculados os valores médios de nucleóides danificados por animal. Para cada tempo experimental o total de nucleóides danificados (1, 2 e 3) obtidos para os tratamentos experimentais foi dividido pelo número de animais amostrados.

4.5 Teste do Micronúcleo

Uma alíquota de 5 μ L de sangue, foi colocada sobre uma lâmina de vidro limpa e seca. Foi então realizado um esfregaço, com o auxílio de uma lamínula de vidro, de forma a deixar sobre a lâmina uma camada uniforme e delgada de sangue. Foram confeccionadas duas lâminas por animal. As lâminas secaram por 24 horas em temperatura ambiente e decorrida esta etapa foram então fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. Em seguida as lâminas foram coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (0,06M Na₂HPO₄, 0,06M KH₂PO₄) por 20 minutos. As lâminas foram então lavadas com água destilada e colocadas para secar a temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas foram preparadas com Entellan para uso permanente. A análise citológica das lâminas foi realizada em microscópio ótico de luz (Olympus) em um aumento de 1000X. Para cada animal foram analisados 1000 eritrócitos.

4.6 Análise estatística

Nas análises estatísticas foram comparados os diferentes tratamentos dentro de cada tempo experimental, e cada tratamento entre si nos diferentes tempos experimentais (6h, 24h, 96h e 15d). Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos, incluindo os controles-negativos e o controle-positivo no tempo de 24h (referência também para os demais tempos experimentais), foram comparados entre si pela análise de variância - critério único (ANOVA *one way*), seguida do teste de comparações múltiplas SNK (Student-Newman-Keuls), quando necessário (Zar, 1996). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

ARTIGO

**Biomarcadores Genéticos para a Avaliação de
Efeitos Genotóxicos do Alumínio em Peixes
Prochilodus lineatus ***

* Trabalho a ser enviado ao periódico científico ***Ecotoxicology and Environmental Safety***

**Biomarcadores Genéticos para a Avaliação de Efeitos Genotóxicos do
Alumínio em Peixes *Prochilodus lineatus***

Bruno Ambrozio Galindo^a, Cláudia Bueno dos Reis Martinez^b, Ilce Mara
Syllos Cólus^a, Sílvia Helena Sofia^{a, *}

^a Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

^b Departamento Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

* Correspondência: Tel +55(43)3371-4437; fax: +55(43)3371-4207
Endereço de e-mail: shsofia@uel.br (S. Helena Sofia)

RESUMO

No presente estudo, as técnicas de RAPD, cometa e micronúcleo (MN) foram empregadas para avaliar o potencial genotóxico do alumínio em meio ácido para a espécie de peixe *Prochilodus lineatus*. Os animais foram submetidos à exposição aguda (6h, 24h, 96) e sub-crônica (15 dias) à concentração de 0,1 mg de Al dissolvido.L⁻¹ (pH 5). Alterações em 11 bandas nos perfis de RAPD de animais pré e pós-exposição sugerem danos ao DNA de indivíduos expostos ao Al e/ou acidez. Aumentos significativos no número de nucleóides danificados e nos índices de escores médios foram detectados especialmente nas exposições agudas de 6h e 24h. As freqüências de MN não se mostraram diferentes em nenhum dos tratamentos. Nas condições experimentais empregadas o Al mostrou-se genotóxico para a espécie estudada. A técnica de RAPD revelou-se sensível na detecção de alterações sofridas pelo DNA e promissora para estudos de genotoxicidade.

Palavras-chave: alumínio, genotoxicidade, RAPD, ensaio do cometa, micronúcleo, *Prochilodus lineatus*.

1. Introdução

A poluição de ambientes aquáticos é um problema sério e crescente em todo o mundo. Apesar de existir uma legislação de conduta a respeito deste problema em vários países, a poluição aquática por produtos químicos tóxicos ainda ocorre. Organismos aquáticos, como peixes e moluscos, acumulam poluentes diretamente a partir da água contaminada e indiretamente por meio da ingestão de organismos contaminados (Van der Oost et al., 2003). Existe uma variedade de poluentes que afetam o ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes. Este número cresce anualmente, considerando que novos compostos e formulações são sintetizados (Martinez e Cólus, 2002). Dentre os agentes contaminantes do ambiente aquático incluem-se diversos metais, tais como cobre, zinco, cádmio, chumbo e alumínio, de efeito reconhecidamente genotóxico sobre a biota aquática (Sanchez-Galan et al., 1999; Martinez; Cólus, 2002; Cestari et al., 2004). A introdução de metais nos sistemas aquáticos ocorre naturalmente através de processos geoquímicos e do intemperismo, enquanto a contribuição atribuída a atividade humana é um reflexo de sua ampla utilização pela indústria (Yabe e Oliveira, 1998). Embora haja na literatura diversos trabalhos que abordem danos causados por vários destes metais em ambientes aquáticos em regiões temperadas (Exley et al., 1996; Poléo et al., 1997; Alstad et al., 2005), ainda são escassas as informações sobre tais agentes contaminantes em ecossistemas aquáticos na região tropical.

Dentre todos os metais, o alumínio é mencionado como um dos elementos de maior toxicidade em corpos de água impactados. Essa toxicidade

está relacionada com uma série de fatores, como a temperatura, a dureza da água e a própria forma do alumínio no meio (livre, ligado ou quelado). Embora esses fatores contribuam para o aumento da toxicidade do alumínio, considera-se que o valor do pH da água tenha maior relevância, pois o alumínio apresenta grande solubilidade em baixos níveis de pH (Gil et al., 1993), especialmente em pH inferior a 6,0 (Baker e Shofield, 1982; Stripp e Trombetta, 1994).

Enquanto um maior número de estudos têm investigado os possíveis efeitos tóxicos do alumínio com base em alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nos organismos aquáticos (Karlsson-Norrgren et al., 1986 apud Stripp; Trombetta, 1994; Stripp e Trombetta, 1994; Barcarolli e Martinez, 2004), poucos são os relatos sobre os possíveis efeitos genotóxicos deste metal sobre tais organismos.

Entre os diversos organismos que habitam os ambientes aquáticos, os peixes têm se mostrado muito adequados em estudos voltados para as análises de tais ambientes. Os efeitos dos contaminantes em peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica: molecular/bioquímico, genético, celular, fisiológico, morfológico, assim como ao nível da população, comunidade e ecossistema (Adams et al., 1990). Diversos estudos genotóxicos realizados com peixes têm demonstrado a sensibilidade de tais organismos a uma extensa gama de agentes genotóxicos (Al-Sabit e Metcalfe, 1995; Çavas e Ergene-Gozukara, 2003a,b; Çavas et al., 2005; Matsumoto et al. 2006; Lemos et al., 2007).

Atualmente, várias são as técnicas laboratoriais disponíveis para avaliar a ação de poluentes que agem diretamente sobre o DNA, facilitando, assim, o

entendimento dos mecanismos envolvidos em danos genéticos e permitindo a avaliação em uma ampla escala dos efeitos no DNA das espécies expostas (Castaño e Bacerril, 2004).

No presente trabalho, as técnicas de RAPD (Williams et al., 1990), ensaio do cometa (Singh et al., 1988) e teste do micronúcleo (MN) (Al-Sabit e Metcalfe, 1995), as quais têm sido freqüentemente usadas em estudos de genotoxicidade, foram empregadas para avaliar o possível efeito do metal alumínio (Al) em peixes neotropicais da espécie *Prochilodus lineatus*, expostos a este metal em condições de acidez (pH = 5,0).

2. Materiais e Métodos

2.1. Espécie estudada

No presente estudo foram utilizados espécimes jovens de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) (= *P. scrofa* Steindachner, 1881), uma espécie de peixe neotropical, popularmente conhecida como curimba, a qual tem se mostrado sensível a substâncias tóxicas do meio (Martinez e Cólus, 2002; Martinez et al., 2004; Simonato et al., 2006), sendo considerado um biodiagnóstico vertebrado potencial para o monitoramento ambiental (Cerqueira e Fernandes, 2002). Antes dos experimentos os peixes, fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), passaram por uma semana de aclimação (com aeração constante, $\cong 20^{\circ}$ C, pH $\cong 7,0$ e fotoperíodo de 14 h de escuro e 10 h de luz).

2.2. Exposição

Foram realizados três tipos de experimentos, do tipo estático: pH 7,0 + 0 mg Al.L⁻¹ (grupo controle-negativo), pH 5,0 + 0 mg Al.L⁻¹ (grupo acidez) e pH 5,0 + 0,1 mg Al.L⁻¹ (grupo Al + acidez). Amostras foram feitas nos tempos de 6h, 24 h, 96 h (ensaios agudos) e 15 dias (ensaio sub-crônico). Em cada tratamento foram mantidos 6 peixes em aquários de 100 L (aeração constante, $\cong 20^{\circ}$ C, pH $\cong 7,0$ e fotoperíodo de 14 h de escuro e 10 h de luz), com réplicas para todos os tratamentos. Nos tratamentos de acidez o pH foi diminuído a 5,0 pela adição de HCl 50%, sendo monitorado a cada 6 horas para a manutenção de forma constante do pH no valor de aproximadamente 5,0. O Al foi

adicionado à água na forma de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. A concentração de alumínio utilizada foi de $0,1 \text{ mg Al.L}^{-1}$ (= 0,1 ppm), a qual constitui a concentração limite permitida pela resolução CONAMA no. 357/2005.

No experimento de 15 dias, a concentração de alumínio utilizada foi a de $0,05 \text{ mg Al.L}^{-1}$ (= 0,05 ppm), já que em experimentos anteriores com a concentração de $0,1 \text{ mg Al.L}^{-1}$ os animais não sobreviveram durante todo o período experimental. Ainda durante este experimento, metade da água dos aquários foi renovada a cada 5 dias (120h) e a cada renovação a quantidade de alumínio correspondente a metade da dose inicial foi repostada, visando manter inalterada a concentração de alumínio.

Foi realizado também um ensaio de controle positivo, no qual 8 exemplares de *P. lineatus* foram anestesiados, marcados e tiveram a nadadeira adiposa retirada. Ainda anestesiados os animais receberam uma injeção intraperitoneal de ciclofosfamida ($0,04 \text{ mg.g}^{-1}$). Os animais foram mantidos em aquários durante 24h, nas mesmas condições dos grupos experimentais.

2.3. Amostragens

Imediatamente após a retirada do peixe da água, este foi anestesiado com benzocaína, na concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$. Em seguida foram retiradas amostras de sangue através da veia caudal com o auxílio de seringas heparinizadas e estas amostras foram divididas em duas alíquotas para a utilização nos testes do cometa e do micronúcleo. Por último o animal foi sacrificado por secção medular para a retirada da brânquia e do fígado.

2.4. Procedimento de marcação dos animais

Anteriormente ao período de aclimação, os peixes foram anestesiados para a retirada da nadadeira adiposa e marcação dos indivíduos com uma abraçadeira de plástico branco com numeração específica para cada indivíduo. A marcação dos peixes foi feita para a identificação dos diferentes indivíduos e posterior comparação dos perfis de RAPD dos animais pré e pós-exposição ao tratamento. Após a marcação, os peixes foram submetidos a um “banho de sal”, onde os animais permaneciam em uma solução de NaCl (15g/L) por aproximadamente 15 segundos, com a finalidade de eliminar qualquer microrganismo que pudesse se prejudicial a saúde dos animais.

2.5. RAPD

O DNA total utilizado nas análises de RAPD foi obtido a partir da nadadeira adiposa, brânquia e o fígado dos animais. A nadadeira adiposa foi retirada antes do período experimental e forneceu o perfil de RAPD pré-exposição, enquanto a brânquia e o fígado foram amostrados após o período experimental e forneceram os perfis de RAPD pós-exposição. A escolha da brânquia e do fígado foi feita com base, respectivamente, na exposição e função destes órgãos, que tornam as células de ambos potencialmente sujeitas a danos no material genético.

A extração, quantificação e amplificação do DNA foi baseada em Sofia et al. (2006), com algumas modificações. Antes da extração do DNA das brânquias, visando diminuir a quantidade de muco deste tecido, as brânquias dos peixes foram submersas em etanol 100% por 24 horas, a 5°C, com o álcool

sendo trocado a cada 6 horas. Após este período, o material foi lavado três vezes com água ultrapura.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 15 μ L contendo de 4-20 ng de DNA, 250 μ M de dNTP (Pharmacia), 0,33 μ M de *primer* (Operon Technologies), 3,3 mM de MgCl₂, 1U de *Taq*, tampão de reação 10x (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl) e água estéril. Todas as reações de amplificação foram acompanhadas por reações controle, contendo todos os reagentes e água em substituição ao DNA.

Para a amplificação do DNA foi utilizado um termocilcador (PTC-100, MJ Research, Inc.) programado para realizar 40 ciclos após desnaturação inicial de 4 minutos a 92°C. Cada ciclo foi constituído de três fases, sendo elas: desnaturação, pareamento (anelamento) e extensão. A fase de desnaturação tem a duração de 40 segundos na qual a temperatura se mantém a 92°C, já a fase de pareamento tem a duração de 1 minuto e meio com temperatura de 40°C e, por fim, a fase de extensão que mantém a temperatura a 72°C durante 2 minutos. Após os 40 ciclos segue-se ainda uma fase de extensão final na qual a temperatura é mantida em 72°C durante 5 minutos.

Amostras de 15 μ L dos produtos das amplificações foram submetidas a eletroforese, 3 Vcm⁻¹, em géis de agarose 1,4%, em tampão de corrida TBE (Tris 0,89M; ácido bórico 0,89 M e EDTA 0,02 M pH 8,3) diluído 1:20. Os géis foram, então, corados em brometo de etídio, visualizados em transiluminador UV e fotografados em sistema de digitalização Kodak EDAS 290. Um marcador de peso molecular 100pb (Amersham Biosciences) foi aplicado ao gel para a estimativa dos pesos moleculares das diferentes bandas. O

programa computacional *Fragment Length Calculator* 3.5.0. foi empregado para o cálculo do peso molecular das bandas.

As análises de RAPD foram feitas com base nos três perfis de RAPD obtidos para cada animal e, incluíram uma comparação entre os perfis obtidos das amplificações das amostras extraídas da nadadeira (pré-exposição) e os perfis eletroforéticos obtidos das amplificações das amostras das brânquias e do fígado (pós-exposição) dos peixes. Quando constatada alteração no perfil eletroforético de algum indivíduo, foram realizadas três repetições das reações de RAPD para verificar a consistência do resultado. Confirmada a alteração foram calculados os pesos moleculares das bandas que surgiram ou desapareceram.

2.6. Ensaio do cometa e teste do micronúcleo

A metodologia do ensaio do cometa utilizada foi baseada em Singh et al. (1988), com algumas modificações. Para o ensaio do cometa uma alíquota de 10 μL de sangue foi diluída em 1000 μL de solução salina de peixe (17 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,5 mM CaCl, 1,2 mM NaHCO₃, 4,5 mM Na₂HPO₄, 2,9 mM NaH₂PO₄) Em seguida, as lâminas de vidro previamente cobertas com uma camada agarose normal 1,5%, receberam 135 μL de agarose *low melting point* (37°C) 0,5% contendo 15 μL do sangue diluído. Estas lâminas foram então colocadas no tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, Triton X-100 1%), pH 10,0 (4°C) por pelo menos 1 hora. Após a lise, as lâminas foram incubadas em tampão (0,3 N NaOH / 1 mM EDTA) pH > 13,0 por 20 minutos, para a desnaturação do DNA, e, subsequentemente, submetidas a eletroforese, 25V e 300 mA por 20 min (3°C). Após este período, as lâminas foram neutralizadas em tampão 0,4 M Tris, pH 7,5, durante 5 min, com 3

repetições, sendo então fixadas em etanol 100% por 10 minutos e coradas com brometo de etídio ($0,02 \text{ mg mL}^{-1}$). As lâminas foram, então, examinadas ao microscópio de fluorescência (Nikon) equipado com um filtro de excitação de $\lambda = 515\text{-}560 \text{ nm}$ e um filtro de barreira para 590 nm . Para cada animal foram analisados 100 nucleóides. Os nucleóides foram visualizados e classificados de acordo com a migração dos fragmentos de DNA (0: sem dano, 1: com dano mínimo, 2: com dano médio, 3: com dano máximo) (Kobayashi et al., 1995). Nas análises foram estimados o número médio de nucleóides danificados e o escore médio com base no número de nucleóides danificados e não danificados; para este último cálculo empregou-se a seguinte fórmula: $\text{Escore} = (0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$, onde: A, B, C e D são os números de células encontradas para cada categoria de dano.

Para o teste do micronúcleo (Al-Sabit e Metcalfe, 1995). amostras de sangue de cada animal foram coletadas como descrito acima. Para cada animal foram confeccionadas duas extensões sangüíneas em lâminas de vidro. Após 24 h este material foi fixado em metanol absoluto por 10 min e em seguida corado com Giemsa (5%) durante 20 min. Para a determinação dos eritrócitos com e sem micronúcleos foram analisadas 1000 células por animal.

2.7. Análise estatística

Nas análises estatísticas foram comparados os diferentes tratamentos dentro de cada tempo experimental, e cada tratamento entre si nos diferentes tempos experimentais (6h, 24h, 96h e 15d). Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos, incluindo os controles-negativos e o controle-positivo no tempo de 24h (referência também para os demais tempos experimentais),

foram comparados entre si pela análise de variância critério único (ANOVA *one way*), seguida do teste de comparações múltiplas SNK (Student-Newman-Keuls) quando necessário (Zar, 1996). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Análise de RAPD

Os animais analisados foram divididos em 3 grupos experimentais: Controle (C), Acidez (Ac) e Alumínio + Acidez (Al +Ac). Para o tempo de 6 horas foram utilizados 20 animais (6 C, 4 Ac e 10 Al + Ac), nos tempos de 24h e 96 horas foram utilizados 23 animais (6 C, 6 Ac e 11 Al + Ac) e para o experimento de 15 dias foram utilizados 13 animais (5 C, 4 Ac e 4 Al+Ac).

Para as análises de RAPD foram selecionados 9 *primers*: OPW4, OPW6, OPW7, OPW8, OPW9, OPW11, OPX6, OPX17 e OPC2.

A Fig. 1 mostra um perfil de RAPD obtido com o *primer* OPW4 para o tempo de 24h. Observa-se na Fig. 1 uma elevada repetibilidade no padrão de bandas entre os diferentes tecidos de um mesmo indivíduo. O mesmo padrão elevado de repetibilidade pode ser observado também na Fig. 2, em que é possível se verificar uma nítida repetibilidade em três perfis de RAPD dos diferentes órgãos e em três reações diferentes. Adicionalmente, comparando-se as Figs. 1 e 2 verifica-se a repetibilidade entre reações que foram feitas em dias distintos, realizadas com estoques de reagentes diferentes e amostras submetidas às eletroforeses distintas.

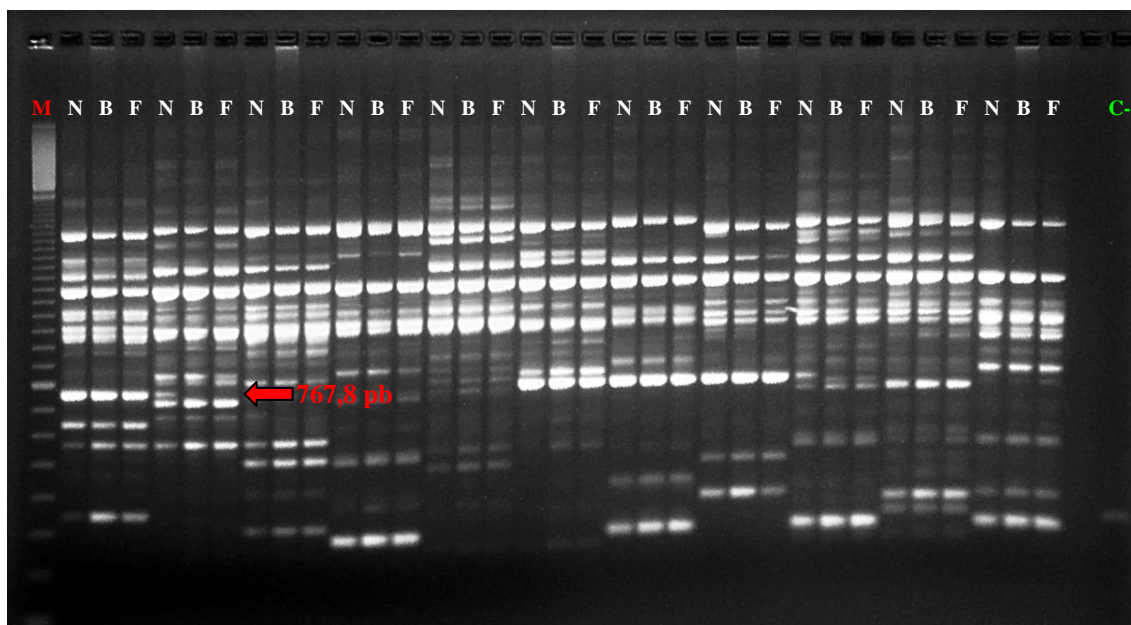


Fig. 1. Perfil eletroforético de RAPD obtido com o *primer* OPW4, para indivíduos pertencentes ao grupo experimental AI+Ac do experimento de 24h. A coluna **M** representa o Marcador de 100 pb, as letras **N**, **B** e **F** indicam respectivamente o DNA extraído da nadadeira adiposa, brânquia e fígado de um mesmo indivíduo. A coluna **C** - indica o controle negativo. A seta indica a banda OPW4_767,8.

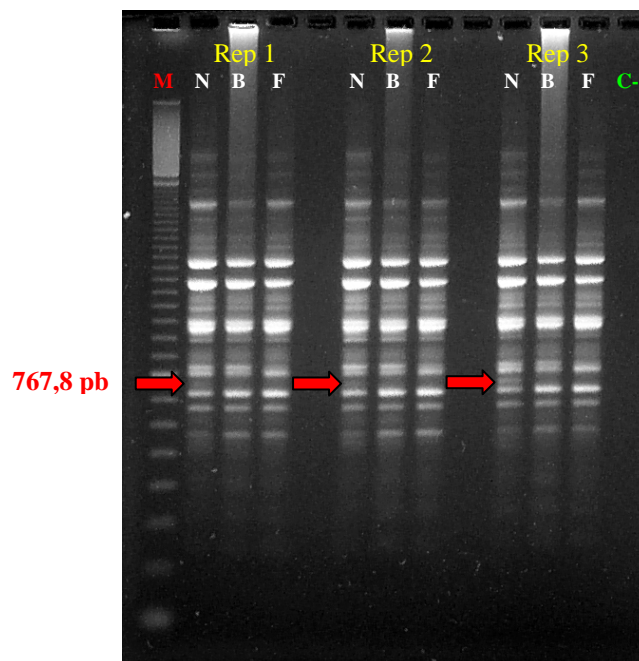


Fig. 2. Perfil eletroforético das três repetições (Rep 1, Rep 2, Rep 3) de RAPD obtido com o *primer* OPW4, para o indivíduo 33 pertencente ao grupo experimental Al+Ac do experimento de 24h. A coluna **M** representa o Marcador de 100 pb, as letras **N**, **B** e **F** indicam, respectivamente, o DNA extraído da nadadeira adiposa, brânquia e fígado de um mesmo indivíduo. A coluna **C** - indica o controle-negativo. As setas indicam a banda OPW4_767,8 que está presente na nadadeira, porém ausente na brânquia e fígado.

Os 9 *primers* utilizados produziram um número similar de bandas para os diferentes tempos experimentais, bem como para o controle positivo (24h): 260 bandas (6h), 257 (24h), 219 (96h), 251 (15 dias) e 273 bandas (controle positivo).

Do total de bandas analisadas foram detectadas alterações nos perfis de RAPD de animais submetidos aos experimentos de 6h, 24h, 15 dias e no controle positivo. Dos 9 *primers* utilizados nas análises de RAPD, 7 se mostraram sensíveis para a identificação de alterações de perfis de RAPD de *P. lineatus* expostos ao alumínio+acidez e a acidez, entretanto três destes (OPW9, OPX6 e OPX17) mostraram também uma variação no perfil

eletroforético de animais do grupo controle-negativo. Na Tabela 1 são apresentadas as bandas e seus respectivos pesos moleculares, que mostraram variação nos diferentes tecidos analisado para estes tempos experimentais.

Tabela 1

Alterações nos padrão de bandas nos perfis de RAPD entre órgãos coletados pré-exposição (nadadeira adiposa [N]) e pós-exposição (brânquia [B] e fígado [F]). A coluna PM indica o peso molecular de cada banda em pares de base (pb). O sinal de + (mais) indica presença da banda e o sinal de – (menos) indica a ausência da banda.

Tempo Experimental	Primer	N	B	F	PM (pb)	Grupo Experimental
6 h	OPW8	+	-	-	1391,2	Al + Ac
	OPX6	-	+	+	886,8	Al + Ac
	OPX6	+	-	-	876,3	Controle-negativo
	OPX17	-	+	+	509,1	Al + Ac
	OPX17	-	+	+	409,2	Controle-negativo
24 h	OPW4	+	-	-	767,8	Al + Ac
	OPW7	-	+	+	512,8	Al + Ac
	OPW7	-	+	+	512,8	Al + Ac
15d	OPW9	-	+	-	848,3	Controle-negativo
	OPW9	-	-	+	469,8	Al*+ Ac
	OPW7	+	-	+	1167,5	Al + Ac
	OPX17	-	+	+	507,5	Acidez
Controle-positivo	OPC2	+	-	-	805	Ciclofosfamida
	OPC2	-	+	+	1279,3	Ciclofosfamida

Al* = concentração de 0,05 mg Al.L⁻¹

Nas exposições agudas de 6h e 24h, observou-se uma tendência entre brânquia e fígado de mostrarem a mesma variação no perfil de RAPD, com o aparecimento e o desaparecimento de bandas ocorrendo igualmente nestes dois órgãos, mas não na nadadeira. Esta mesma tendência ocorreu no controle positivo, mas não nos animais submetidos à exposição de 15 d.

3.2. Teste do cometa

Nas exposições agudas (6h, 24h e 96h) e na sub-crônica (15 dias), a frequência média de nucleóides danificados foi estatisticamente maior ($P < 0,05$) no controle positivo quando comparado com qualquer outro grupo experimental (controle-negativo, Ac e Al+Ac), (Tabela 2). No tempo de 6h a média de nucleóides danificados do grupo Al+Ac foi estatisticamente maior do que seu grupo controle-negativo. Para o experimento de 24h a quantidade média de nucleóides danificados do grupo experimental Ac foi significativamente maior do que a encontrada para os grupos controle-negativo e alumínio; ainda, o grupo Ac de 24h mostrou um maior número de nucleóides danificados ($P < 0,05$) do que os peixes do grupo Ac (96h), (Tabela 2).

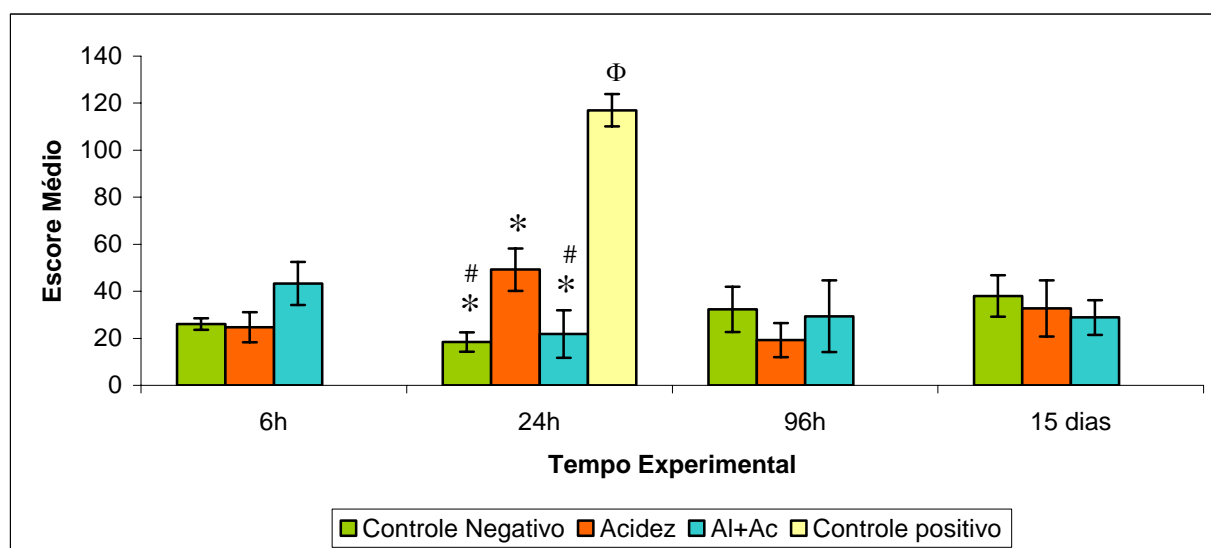
Na Fig. 3 são mostrados os escores médios obtidos para os diferentes tratamentos e tempos experimentais. Todos os grupos experimentais mostraram escores médios estatisticamente menores do que o controle positivo ($P < 0,05$). Os grupos Al+Ac (6h) e Ac (24h) apresentaram valores de escores médios significativamente maiores do que os apresentados pelos seus respectivos grupos controle-negativo. Um valor de escore médio significativamente maior foi encontrado para o grupo Ac (24h) quando comparado com o grupo Al+Ac (24h).

Tabela 2

Média de nucleóides observados em cada classe de cometa (0, 1, 2, e 3) e média de nucleóides danificados por animal em eritrócitos de *P. lineatus* expostos a acidez e ao alumínio em pH ácido, considerando-se o número total de animais analisados (N) para cada tratamento experimental e seus controles positivos e negativos.

Tempo Experimental	Tratamentos	Média de Nucleóides nas Classes de Cometas					Média de Nucleóides Danificados por Animal ± Erro Padrão
		N	0	1	2	3	
6h	Controle-negativo	12	74,3	25,3	0,3	0	25,67 ± 2,41
	Acidez	10	75,4	24,5	0,1	0	24,6 ± 6,36 ^{a,b}
	Alumínio+Acidez	9	58,8	39,1	2,1	0	41,22 ± 8,53 ^{*,c}
24h	Controle-negativo	10	81,6	18,4	0	0	18,4 ± 4,18
	Controle-positivo	7	11,3	63,0	23,1	2,6	88,71 ± 3,77 [*]
	Acidez	11	54,9	41,1	3,9	0,1	45,09 ± 6,85 ^{*,a}
	Alumínio+Acidez	10	80,6	17,3	1,8	0,3	19,4 ± 8,12 ^{#,c}
96h	Controle-negativo	10	70,6	26,6	2,7	0,1	29,4 ± 8,30
	Acidez	10	81,5	17,8	0,7	0	16,8 ± 7,07 ^b
	Alumínio+Acidez	9	75,2	21,3	2,3	1,1	24,78 ± 11,69 ^c
15 d	Controle-negativo	5	63,2	35,6	1,2	0	36,8 ± 8,82
	Acidez	6	68,8	29,7	1,5	0	31,17 ± 11,08 ^{a,b}
	Alumínio+Acidez	6	73,8	23,5	2,7	0	26,17 ± 5,94 ^c

* diferente estatisticamente do seu controle-negativo ($P < 0,05$); # diferente estatisticamente do seu grupo acidez ($P < 0,05$); letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$); *** = o controle-positivo foi estatisticamente maior que todos os demais tratamentos.



* diferente estatisticamente do controle-positivo ($P < 0,05$)

diferente estatisticamente do grupo acidez ($P < 0,05$)

Φ diferente estatisticamente do controle negativo ($P < 0,05$)

Fig. 3. Escores médios no ensaio do cometa para *P. lineatus* expostos aos diferentes grupos experimentais (controle-negativo, Ac e Al+Ac) sob tratamentos agudos (6h, 24h e 96h) e sub-crônicos (15dias). As barras representam os erros padrão.

3.3. Teste do micronúcleo

O número total e a frequência média de micronúcleos observados em cada grupo experimental para os testes agudos e sub-crônicos são apresentados na Tabela 3. Os valores nas frequências médias de micronúcleos tanto para o controle-negativo quanto para os grupos Ac e Al+Ac mostraram-se extremamente baixos, variando de zero a 0,30. Portanto, as análises estatísticas não revelaram diferenças significativas nas frequências médias de micronúcleos para os diferentes tratamentos e nem para os diferentes tempos de um mesmo tratamento (Tabela 3).

Tabela 3

Freqüência média de eritrócitos micronucleados obtidos em *P. lineatus* após exposições agudas (6, 24 e 96h) e sub-crônica (15 dias) a acidez, alumínio em pH ácido e controle-negativo.

Tempo Experimental	Tratamentos	N	Freqüência média de micronúcleos ± Erro Padrão
24h	Controle-negativo	12	0
	Acidez	11	0
	Alumínio+Acidez	12	0,17 ± 0,11
96h	Controle-negativo	11	0,09 ± 0,09
	Acidez	11	0,18 ± 0,12
	Alumínio+Acidez	11	0,27 ± 0,14
15 dias	Controle-negativo	5	0
	Acidez	10	0,30 ± 0,15
	Alumínio+Acidez	9	0,22 ± 0,15

4. Discussão

O desenvolvimento de novas metodologias e aplicação de técnicas mais refinadas para a avaliação da genotoxicidade em oceanos e águas continentais são alvo de vários estudos científicos (Van der Oost et al., 2003). A utilização de várias destas técnicas nas últimas duas décadas têm permitido grandes avanços na avaliação do impacto genotóxico de agentes químicos e físicos em organismos aquáticos (Jha, 2004). No presente estudo a técnica de RAPD, o ensaio do cometa e teste do MN, foram usados para avaliar o efeito do metal Al para *P. lienatus*, uma espécie de peixe com ampla distribuição na região neotropical.

Vários estudos que empregaram a técnica de RAPD para a análise do efeito genotóxico de diferentes compostos sobre diversos tipos de organismos (ex. peixes, plantas e camundongos) utilizaram entre 6 e 11 *primers* para a obtenção dos perfis de RAPD. Desta forma, o número de *primers* utilizados no presente trabalho encontra-se dentro da amplitude destes estudos. Contudo, as quantidades de bandas obtidas em tais estudos têm se mostrado bastante variável, com uma amplitude de variação entre 78 (Zhiyi e Haowen, 2004) a 467 bandas (Enan, 2006). Neste último caso, o elevado número de bandas obtido pode ser atribuído às condições distintas de protocolo empregadas pelos autores, tais como uma menor temperatura de anelamento do *primer* (36°C), em comparação com o presente trabalho (ex. temperatura de anelamento = 40°C). Sabe-se que quanto menor a temperatura de anelamentos em reações de PCR, menor a especificidade do *primer* para sítios restritos do DNA, gerando um maior número de fragmentos amplificados (Matioli e Passos-Bueno, 2001).

Embora seja uma técnica amplamente utilizada em diversos estudos, a técnica de RAPD tem sido alvo de várias críticas nas últimas décadas em virtude da baixa repetibilidade nos perfis eletroforéticos obtidos por diferentes autores (Ayliffe et al., 1994; Pérez et al., 1998; Rabouam et al., 1999). Contudo, uma adequada otimização do protocolo de RAPD, incluindo cuidados nas concentrações dos reagentes (ex. $MgCl_2$) e condições de amplificação podem reduzir significativamente esta falta de repetibilidade (Chiappero e Gardenal, 2001). No presente estudo, devido a uma série de cuidados e testes de otimização, foram alcançados níveis muito satisfatórios de repetibilidade (Figs. 1 e 2).

Atienzar et al. (2002), ao expor larvas de craca a dois compostos (4-n-Nonylphenol and 17- β estradiol), na comparação do grupo experimental com o grupo controle, detectaram o aparecimento, desaparecimento e, também, a alteração na intensidade de bandas. Segundo estes autores, os efeitos ao DNA detectados pela técnica de RAPD incluem danos ao DNA (aductos e quebras) bem como mutações (mutações de ponto e grandes rearranjos no DNA) e, possivelmente, outros efeitos em nível de DNA que podem ser induzidos por agentes químicos e físicos que direta e/ou indiretamente interagem com o DNA genômico.

Alterações no sítio de anelamento poderiam impedir a ligação do *primer*, levando a uma perda do respectivo produto de amplificação. Alternativamente, novos sítios de anelamento podem ser gerados por mutações no DNA molde produzindo, deste modo, novos fragmentos (Enan, 2006). Assim, o surgimento de novas bandas, como no caso das bandas OPX6_886,8 (6h), OPW7_512,8 (24h) e OPX17_507,5 (15d) nos DNAs da brânquia e do fígado (Tabela 1),

poderia ser devido ao surgimento de novos sítios de anelamento dos *primers*. Adicionalmente, o desaparecimento de bandas, a exemplo das bandas OPW4_767,8 (6h) e OPW4_767,8 (24h), podem estar relacionados a perda de sítios de ligação do *primer* levando ao desaparecimento de tais bandas. Segundo Enan (2006), os principais eventos observados após a exposição a metais pesados, foram as variações no desaparecimento e aparecimento de novas bandas.

Lankoff et al. (2006) trabalhando com cultura de células de linfócitos expostos por 72 h a diferentes concentrações (4,15 a 103,75 μg de $\text{AlCl}_3 \cdot \text{mL}^{-1}$) de alumínio observaram danos genotóxicos dose dependente, que estabilizaram a partir de 10 μg de $\text{AlCl}_3 \cdot \text{mL}^{-1}$. Embora a concentração de alumínio usada no presente estudo seja muito inferior (0,1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) à concentração usada por estes autores, deve-se ressaltar que Lankoff et al. (2006) não submeteram as células a um pH ácido. De acordo com Stripp e Trombetta (1994) um decréscimo em uma unidade de pH abaixo de 5,6 resulta em um aumento de mil vezes na solubilidade do alumínio.

No experimento de 96h, apesar de ter sido detectado alterações no padrão de bandas dos perfis eletroforéticos de RAPD na primeira amplificação, quando foram realizadas as repetições tais alterações não se confirmaram. Neste caso, é provável que as alterações obtidas na primeira amplificação das amostras sejam decorrentes de uma falta de repetibilidade nos perfis de RAPD obtidos e não a alterações do DNA. Rabouam et al. (1999) relatam a incidência de falsas bandas geradas em algumas amplificações de RAPD. Um outro problema que pode também estar relacionado a questões de procedimento relaciona-se ao aparecimento e desaparecimento das bandas, a exemplo das

bandas OPX17_409,2 e OPX6_876,3 em animais do grupo controle-negativo (Tabela 1); nestes casos, o aparecimento das bandas pode ser devido a algum possível problema de contaminação da amostra com DNA exógeno, por exemplo. Segundo Savva (2000), um dos cuidados principais que devem ser tomados ao se empregar a técnica de RAPD é evitar a contaminação das amostras por outros DNAs, o que resultaria em bandas falsas e uma análise equivocada.

A falta de alterações nos perfis de RAPD de animais expostos durante 96 h aos diferentes tratamentos, em particular ao tratamento de Al+Ac, é difícil de ser explicada. Talvez, uma explicação plausível para este fato seja a de que o maior tempo de duração do experimento de 96 h em relação aos tempos experimentais (6 h e 24 h) tenha possibilitado a ativação de forma mais eficiente do sistema de reparo de DNA das células dos indivíduos submetidos ao estresse do agente causador de danos. Simonato et al. (2006) observaram uma maior atividade de enzimas detoxificantes (como GST) em *P. lineatus* após 96 h, indicando uma possível ocorrência de danos oxidativos às células do fígado destes animais. Stripp e Trombetta (1994) observaram um aumento significativo na atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) em tecidos de trutas de ambientes de pH ácido (4,3 a 5,0) contendo concentrações de alumínio variando de 221 a 340 $\mu\text{g.L}^{-1}$; entretanto, além do alumínio outros metais encontravam-se também presentes nos ambientes estudados. Segundo estes autores, o alumínio é mais tóxico em um pH entre 5,0 e 5,5 aumentando indiretamente a peroxidação de lipídios das membranas causada por outros metais tais como ferro, alterando assim a integridade da membrana e provocando vários danos celulares. Deste modo, as alterações nos perfis de

RAPD encontradas no presente estudo podem ser atribuídas a possíveis danos ao material genético decorrentes da ação principalmente do alumínio em ambiente ácido (Al+Ac), que estaria ocasionando algum tipo de estresse oxidativo a órgãos como brânquia e fígado.

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa para uma exposição de 6h ao alumínio em pH ácido apontam para danos no material genético dos animais expostos. Contudo, observa-se que tais danos aparentemente sejam passíveis de reparo ao longo do tempo, desde que nos demais tempos experimentais este metal não se mostrou genotóxico aos peixes. De forma similar, Martinez e Cólus (2002), fazendo uso do teste de MN para avaliar o efeito genotóxico do alumínio em *P. lineatus*, encontraram danos ao DNA no tempo de 24h e ausência de danos em animais expostos ao Al em intervalos de 48h, 72h e 96h. Segundo Vanzella (2006), em testes de MN, a exposição de 24h é o melhor tempo experimental para detectar danos genotóxicos em *P. lineatus*, pois neste intervalo de tempo as lesões celulares ocorridas não foram reparadas. Como discutido acima, de forma diversa aos resultados obtidos com o ensaio do cometa, a técnica de RAPD revelou danos ao material genético de *P. lineatus* em animais expostos a um maior número de tempos experimentais (6h, 24h e 15d). Tal fato pode ser devido às diferenças inerentes aos dois tipos de metodologias, pois no caso do RAPD pequenas alterações nos sítios de ligação dos *primers* (ex. mutação de ponto) podem resultar em alterações nos perfis de eletroforéticos (Williams et al., 1990; Atienzar et al., 2002); enquanto que, o ensaio do cometa evidencia quebras primárias na fita de DNA (Singh et al., 1988).

Estudos que avaliam os efeitos genotóxicos de metais em diferentes espécies de peixes têm investigado, principalmente, a ação de metais pesados sobre tais organismos (Sanchez-Galan et al., 1999; Cestari et al., 2004; Çavas et al., 2005; Matsumoto et al., 2006).

Alguns trabalhos têm mostrado que diferentes espécies de peixes apresentam níveis variados de sensibilidade a determinados compostos, incluindo metais. Ou mesmo que, uma mesma espécie pode apresentar níveis distintos de sensibilidade a diferentes compostos (Sanchez-Galan et al., 1999; Martinez e Cólus, 2002; Rodriguez-Cea et al., 2003). Vanzella (2006), empregando os ensaios do cometa e MN, detectou um acentuado efeito genotóxico da fração solúvel do óleo diesel sobre *P. lineatus*. Martinez e Cólus (2002) comparando o efeito dos metais alumínio e chumbo para esta mesma espécie de peixe observaram que o chumbo mostrou-se muito mais genotóxico para *P. lineatus*. Assim, embora *P. lineatus* se mostre em alguns estudos uma espécie sensível a alguns agentes estressores (Martinez e Cólus, 2002; Martinez et al., 2004; Simonato et al., 2006; Vanzella, 2006), as condições utilizadas no presente trabalho se mostraram pouco genotóxicas para esta espécie.

Poléo et al. (1997) em um trabalho utilizando o alumínio em pH ácido, não atribui toxicidade ao pH 5,0 quando considerado de forma isolada. Porém, tem sido sugerido que condições de pH baixo podem ocasionar o aumento nos níveis de estresse oxidativo para alguns organismos aquáticos, embora os mecanismos envolvidos nos efeitos de variações de pH na geração de radicais livres ainda não estejam totalmente compreendidos (Bagnyukova et al., 2006). Estes autores mostraram que alterações de pH resultaram em um aumento das

proteínas carbonílicas (indicadoras de danos oxidativos) no fígado e no rim de *Carassius auratus* (peixinho dourado). Trabalhos na literatura mostram que o estresse oxidativo, resultante da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou diminuição nas defesas antioxidantes dos organismos, pode causar danos ao material genético (Picada et al., 2003). Assim, no presente estudo, os danos genotóxicos evidenciados tanto pelo ensaio do cometa (Figura 3), quanto pela técnica de RAPD (Tabela 1) para indivíduos de *P. lineatus* do grupo acidez, podem estar refletindo danos ao DNA resultantes do estresse oxidativo causado pela própria acidez do meio.

O teste do micronúcleo é normalmente empregado para detecção de danos cromossômicos do tipo clastogênese e aneugênese e danos no fuso mitótico de eucariotos (VILLELA et al., 2003). Assim, as baixas freqüências de MN detectadas no presente trabalho sugerem que tais tipos de danos causados ao DNA de *P. lineatus* não devem ter ocorrido nas condições utilizadas no presente estudo. Valores de freqüência de MN similares foram observados também por Martinez e Cólus (2002) para *P. lineatus* expostos ao mesmo metal.

Por fim, os resultados encontrados indicam que nas condições empregadas no presente trabalho, o Al se mostrou pouco genotóxico para a espécie estudada. Tais resultados indicam que o nível de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de alumínio dissolvido estabelecido pela resolução CONAMA 357 (2005) para rios e lagos brasileiros pode ser considerado seguro para *P. lineatus* no que se refere a danos genéticos para esta espécie. Contudo, entre as principais ameaças aos ambientes aquáticos, está a chuva ácida e seus efeitos associados sobre a biota aquática (Stripp e Trombetta, 1994). No Brasil,

algumas regiões apresentam os corpos d'água com características de maior acidez, a exemplo de alguns rios da Amazônia. Assim, estudos que investiguem a ação do alumínio e outros metais em ambientes com diferentes condições de pH tornam-se necessários para uma maior compreensão do efeito de metais em meios ácidos em espécies de peixes neotropicais.

5. Referências

Adams, S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations contaminant stress. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R., Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, pp. 333-353.

Al-Sabit, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135.

Alstad, N.E.W., Kjelsberg, B.M., 2005. Vollestad, L. A.; Lydersen, E.; Poléo, A. B. S. The significance of water ionic strength on aluminium toxicity in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environ. Pollut.* 133, 333-342.

Atienzar, F.A., Bilinghurst, Z., Depledge, M.H., 2002. 4-n-Nonylphenol and 17- β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environ. Pollut.* 120, 735-738.

Ayliffe, M.A., Lawrence, G.J., Ellis J.G., Prior, A.J., 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic Acids Res.* 22, 1632-1636.

Baker, J.P., Schofield, C.L., 1982. Aluminum toxicity to fish in acidic waters *Water, Air, Soil Pollut.* 18, 289-309.

Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325-331.

Barcarolli, I.F., Martinez, C.B.R., 2004. Effects of aluminium in acid water on hematological and physiological parameters of neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 639-646.

Castaño, A., Becerril, C., 2004. In vitro assessment of DNA damage after short- and long-term exposure to benzo(a)pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutat. Res.* 552, 141-151.

Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2003a. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutat. Res.* 534, 93-99.

Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2003b. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81-91.

Çavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem. Toxicol.* 43, 569-574.

Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill fish recovery after Cooper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 83-91.

Cestari, M.M., Lemos, P.M.M., Ribeiro, C.A.O., Costa, J.R.M.A., Pelletier, E., Ferraro, M.V.M., Mantovani, M.S., 2004. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genet. Mol. Biol.* 27, 270-274.

Chiappero, M.B., Gardenal, C.N., 2001. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population studies of *Calomys musculus* (RODENTIA, MURIDAE) the reservoir of argentine hemorrhagic fever. *Hereditas* 135, 85-93.

CONAMA (2005) – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>. acessado em 11/12/2006.

Enan, M.R., 2006. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43, 147-154.

Exley, C., Wicks, A.J., Hubert, R.B., Birchall, J.D., 1996. Kinetic Constraints in acute aluminium toxicity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Theor. Biol.* 179, 25-31.

Gil, H.A., Correa, M., Grau, J.R., 1993. Efectos del pH y del aluminio em el consumo de oxigeno del pez *Astyanax bimaculatus*. *Acta Cient. Venezol.* 44, 240-244.

Jha, A.N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res.* 552, 1-17.

Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun.* 3, 103-115.

Lankoff, A., Banasik, A., Duma, A., Ochniak, E., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz, S., Wojcik, A., 2006. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 161, 27-36.

Lemos, C. T.; Rödel, P. M.; Terra, N. R.; Oliveira, N. C. D., 2007. Erdtmann, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 391-401.

Lemos, N.G., Dias, A.L., Silva-Souza, A.T., Mantovani, M.S., 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 19, 197-201.

Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Medri, M. E., Bianchini, E., Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. A Bacia Do Rio Tibagi. Londrina, cap. 22, 403-423.

Martinez, C.B., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B., Zaia, D.M. A., 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Braz. J. Biol., 64. 797-807.

Matioli, S.R., Passos-Bueno, M.R.S., 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucleicos. In: Matioli, S.R. (Ed.), Biologia Molecular e Evolução. Holos editora, Ribeirão Preto, pp. 153-161.

Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales, M.A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genet. Mol. Biol., 29. 148-158.

Pérez, T., Albornoz, J.A., Doménguez, A., 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. Mol. Ecol. 7, 1347-1357.

Picada, J.N., Kern, A.L., Ramos, A.L.L.P., Saffi, J., 2003. O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes. In: Silva, J.; Erdtmann, B., Henriques, J.A.P., Genética Toxicológica. Editora Alcance, Porto Alegre, pp. 250-268.

Poléo, A.B.S., Ostbye, K., Oxnevad, S.A., Andersen, R.A., Heibo, E., Vollestad, L.A., 1997. Toxicity of acid aluminium-rich water for seven freshwater fish species: a comparative laboratory study. Environ. Pollut. 96, 129-139.

Rabouam, C., Comes, A.M., Bretagnolle, V., Humbert, J.F., Periquet, G., Bigot, Y., 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. Mol. Ecol. 8, 493-503.

Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 442-448.

Sanchez-Galan, S., Linde, A.R., Garcia-Vazquez, E., 1999. Brown trout and european mennow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 43, 301-304.

Savva, D., 2000. The use of Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) Fingerprinting to detect exposure to genotoxic chemicals. Ecotoxicology. 9, 341-353.

Simonato, J.D., Albinati, A.C., Martinez, C.B.R., 2006. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 76, 505-511.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A., 1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175, 184-191.

Stripp, R.A., Trombetta, L.D., 1994. Anti-oxidant enzyme activity as biomarkers of acid stress in natural aquatic systems. In: Müller, R., Lloyd, R., Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing News Books, pp. 249-261.

Sofia, S.H., Silva, C.R.M., Galindo, B.A., Almeida, F.S., Sodré, L.M.K., Martinez, C.B.R., 2006. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. Hydrobiologia 553, 245-254.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.

Vanzella, P.T., 2006. Efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel do óleo diesel em uma espécie de peixe neotropical. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

Villela, I.V., Lau, A., Silveira, J., Prá, D., Rolla, H.C., Silveira, J.D., 2003. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: Silva, J.; Erdtmann, B., Henriques, J.A.P., Genética Toxicológica. Editora Alcance, Porto Alegre, pp. 147-163.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535.

Yabe, M.J.S., Oliveira, E. 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. Química Nova. 21, 551-556.

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

Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 96-103.

6. Conclusões

- Nas condições experimentais avaliadas, o alumínio mostrou-se pouco genotóxico para *P. lineatus*.
- Nas condições avaliadas observou-se uma tendência de animais expostos ao ensaio agudo de 6h mostrarem um maior número de danos no material genético.
- A metodologia de RAPD mostrou-se eficaz na detecção de danos ao DNA de *P. lineatus* expostos ao Al em pH ácido.
- A técnica de RAPD mostrou-se uma técnica sensível para detecção de alguns danos ao material genético eventualmente não detectados por outros ensaios usados em genética toxicológica.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, S. M.; SHUGART, L. R.; SOUTHWORTH, G. R.; HINTON, D. E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations contaminant stress. In: McCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. **Biomarkers of Environmental Contamination**. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers, p. 333-353. 1990.
- ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P.; SODRÉ, L. M. K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river, **Journal of Zoology**, v. 253, p. 113-120. 2001.
- AL-SABIT, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135. 1995.
- ALSTAD, N. E. W.; KJELSBERG, B. M.; VOLLESTAD, L. A.; LYDERSEN, E.; POLÉO, A. B. S. The significance of water ionic strength on aluminium toxicity in brown trout (*Salmo trutta* L.). **Environmental Pollution**, v. 133, p. 333-342. 2005.
- ATIENZAR, F. A.; JHA, A. N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B (a) P exposed *Daphnia magna*. **Mutation Research**, v. 552, p. 125-140. 2004.
- ATIENZAR, F.; CHILD, P.; EVENDEN, A.; JHA, A.; SAVVA, D.; WALKER, C.; DEPLEDGE, M. Application of the arbitrarily primed polymerase chain reaction for the detection of DNA damage. **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 331-335. 1998.
- ATIENZAR, F. A.; CONRADI, M.; EVENDEN, A. J.; JHA, A. N.; DEPLEDGE, M. H. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo(a)pyrene. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 2275–2282. 1999.
- ATIENZAR, F. A.; CORDI, B.; DONKIN, M. E.; EVENDEN, A. J.; JHA, A. N.; DEPLEDGE, M.H. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detect by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll florescence and grow in a marine macroalgae, *Palmaria palmate*. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 1-12. 2000.
- ATIENZAR, F. A.; VENIER, P.; JHA, A. N.; DEPLEDGE, M. H. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. **Mutation Research**, v. 521, p. 151-163. 2002a.
- ATIENZAR, F. A.; BILINGHURST, Z.; DEPLEDGE, M. H. 4-n-Nonylphenol and 17- β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 735-738. 2002b.

AYLIFFE, M. A.; LAWRENCE, G. J.; ELLIS J. G.; PRIOR, A. J. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p.1632-1636. 1994.

BAKER, J.P.; SCHOFIELD, C. L. Aluminum toxicity to fish in acidic waters **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 18, p. 289–309.1982.

BAGNYUKOVA, T. V.; CHAHRAK, O. I.; LUSHCHAK, V. I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**. 78, 325-331. 2006.

BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminium in acid water on hematological and physiological parameters of neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, p. 639-646. 2004.

BECERRIL, C.; FERRERO, M.; FELIX, S.; CASTAÑO, A. Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. **Mutagenesis**, v. 14, n. 5, p. 449-456. 1999.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fishes exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 93-98. 2006.

CASTAÑO, A.; BECERRIL, C. In vitro assessment of DNA damage after short- and long-term exposure to benzo(a)pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. **Mutation Research**, v.552, p. 141-151. 2004.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. **Mutation Research**, v. 534, p. 93-99. 2003a.

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**, v. 538, p. 81-91. 2003b.

ÇAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574. 2005.

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

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

CHIAPPERO, M. B.; GARDENAL, C. N. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population studies of *Calomys musculinus* (RODENTIA, MURIDAE) THE RESERVOIR OF ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER. **Hereditas**, v. 135, p. 85-93. 2001.

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

CONAMA (2005) – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. In: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>. acessado em 11/12/2006.

DeWOLF, H.; BLUST, R.; BACKELJAU, T. The use of RAPD in ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 566, p. 249-262. 2004.

ENAN, M. R. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 43, p. 147-154. 2006.

KANNETH, B. Periodic Table of Elements – Aluminium – Al. **Environmental Chemistry.com**. 1995-2007. Acesso on-line em: 12/02/2007, <http://EnvironmentalChemistry.com/yogi/periodic/Al.html>

EXLEY, C.; CHAPPELL, J. S.; BIRCHALL, J. D. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. **Journal of Theoretical Biology**, v. 151, p. 417-428. 1991.

EXLEY, C.; WICKS, A. J.; HUBERT, R. B.; BIRCHALL, J. D. Kinetic Constraints in acute aluminium toxicity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Theoretical Biology**, v. 179, p. 25-31. 1996.

FERRERO, M.; CASTAÑO, A.; GONZALES, A.; SANZ, F.; BECERRIL, C. Characterization of RTG-2 fish cell line by Random Amplified Polymorphic DNA. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 56-64. 1998.

GIL, H. A.; CORREA, M.; GRAU, J. R. Efectos Del pH y Del aluminio em el consumo de oxigeno del pez *Astyanax bimaculatus*. **Acta Científica Venezolana**, v. 44, p. 240-244. 1993.

- JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation Research**, v. 552, p. 1-17. 2004.
- KLEINJANS, J. C. S.; SCHOOTEN, F. J. Ecogenotoxicology: the evolving field. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 173-179. 2002.
- KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Communications**, v. 3, p. 103-115. 1995.
- LANKOFF, A.; BANASIK, A.; DUMA, A.; OCHNIAK, E.; LISOWSKA, H.; KUSZEWSKI, T.; GOZDZ, S.; WOJCIK, A. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology Letters**, v. 161, p. 27-36. 2006.
- LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43-64. 2003.
- LEMOS, C. T.; TERRA, N. R. Poluição causas, efeitos e controle. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, cap. 6, p. 119-144. 2003.
- LEMOS, C. T.; RÖDEL, P. M.; TERRA, N. R.; OLIVEIRA, N. C. D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 391-401. 2007.
- LEMOS, N. G.; DIAS, A. L.; SILVA-SOUZA, A. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197-201. 2005.
- LIU, W.; LI, P.J.; QI, X..M.; ZHOU, Q. X.; ZHENG, L.; SUN, T. H.; YANG, Y. S. Dna changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. **Chemosphere**, v. 61, p.158-167. 2005.
- MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A Bacia Do Rio Tibagi**. Londrina, cap. 22, p. 403-423. 2002.
- MARTINEZ, C.B.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.; ZAIA, D.M. A. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 797-807. 2004.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucleicos. in: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos editora, cap. 15, p. 153-161. 2001.

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

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

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

PEAKALL, D. Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman & Hall, London, pp. 290. 1992.

PÉREZ, T.; ALBORNOZ, J. A.; DOMÉNGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1347-1357. 1998.

PICADA, J. N.; KERN, A. L.; RAMOS, A. L. L. P.; SAFFI, J. O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, cap. 12, p. 250-268. 2003.

POLÉO, A. B. S.; Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. **Aquatic Toxicology**, v. 31, p. 347-356. 1995.

POLÉO, A. B. S.; OSTBYE, K.; OXNEVAD, S. A.; ANDERSEN, R. A.; HEIBO, E.; VOLLESTAD, L. A. Toxicity of acid Aluminium-rich water for seven freshwater fish species: a comparative laboratory study. **Environmental Pollution**, v. 96, p. 129-139. 1997.

RABOUAM, C.; COMES, A. M.; BRETAGNOLLE, V.; HUMBERT, J. F.; PERIQUET, G.; BIGOT, Y. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 493-503. 1999.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2^a ed. Washington: Taylor & Francis, p. 23. 1995.

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

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

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

SAVVA, D. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, p. 103-106. 1998.

SAVVA, D. The use of Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) Fingerprinting to detect exposure to genotoxic chemicals. **Ecotoxicology**, v.9, p. 341-353. 2000.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bulletin of Environment Contamination and Toxicology**, v. 76, p. 505-511. 2006.

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

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

SHUGART, L. R.; THEODORAKIS, C. Genetic ecotoxicology: the genotypic diversity approach. **Comparative Biochemistry and Physiology, C: Comparative Pharmacology & Toxicology**, v. 113C, p. 273-276. 1996.

SOFIA, S. H.; SILVA, C. R. M.; GALINDO, B. A.; ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M.K.; MARTINEZ, C. B. R. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, v. 553, p. 245-254. 2006.

SPRY, D. J.; WIERNER, J. Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: a critical review. **Environmental Pollution**, v. 71, p. 243-304. 1991.

STRIPP, R. A.; TROMBETTA, L. D. Anti-oxidant enzyme activity as biomarkers of acid stress in natural aquatic systems. cap. 22, p. 249-261. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing News Books, 1994.

THEODORAKIS, C. W.; BICKHAM, J. W. Molecular characterization of contaminant-indicative RAPD markers. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 303-309. 2004.

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

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 201-204. 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**. v. 13, p. 57-149: 2003.

VANZELLA, P. T. Efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel do óleo diesel em uma espécie de peixe neotropical. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

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

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.

WAUER, G.; HECKEMANN, H.; KOSCHEL, R. Analysis of toxic aluminium species in natural waters. **Microchimica Acta**, v. 146, p. 149-154. 2004.

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

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

ZHIYI, R.; HAOWEN, Y. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 96-103. 2004.