

Impacto da ação antrópica sobre o DNA de *Astyanax* sp. de duas áreas do Córrego Ceroula, Campo Grande-MS, Brasil

Impact of anthropic action on the DNA of *Astyanax* sp. in two areas of the Ceroula stream, Campo Grande-MS, Brazil

RESUMO

O presente estudo avaliou a genotoxicidade em *Astyanax* sp. de 2 áreas do córrego Ceroula/Campo Grande/MS (A1 e A2) com características distintas como estratégia de biomonitoramento. Foi realizado o teste do micronúcleo em eritrócitos para detectar danos no DNA dos peixes. Os resultados demonstraram que os animais de A2 apresentaram maior aumento de eritrócitos micronucleados e núcleos morfologicamente alterados em relação a A1, possivelmente pela maior atividade antrópica no entorno de A2 como ausência de mata ciliar, vegetação constituída de gramíneas e práticas de agricultura no local, enquanto A1 é caracterizada pela presença de mata ciliar residual e ausência da agricultura no entorno.

PALAVRAS-CHAVE: Biomonitoramento, Genotoxicidade, Curso d'água

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the genotoxicity in *Astyanax* sp. from two areas of Ceroula watercourse, in Campo Grande/MS. The area 1 (A1) and area 2 (A2) have distinctive feature. Thus, the micronucleus test was performed in order to evaluate DNA damage in fishes. The animals from A2 present increase in micronuclei number and nuclei morphologically distorted when comparing with A1, possible due higher antropic interference in A2, such as absence of ciliary forest, vegetation consisting by grasses and agricultural practices. On the order hand, A1 is characterized by the presence of residual ciliary forest and absence of agriculture.

KEYWORDS: Biomonitoring, Genotoxicity, Watercourse.

Susana Elisa Moreno

Bióloga, Doutora em Farmacologia e Docente do Programa de Mestrado em Biotecnologia Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande, MS, Brasil
smoreno@ucdb.br

Juceli Gonzalez Gouveia

Bióloga, mestranda em Genética e Biologia Molecular Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil
juceligouveia@yahoo.com.br

Brunna Mary Okubo

Bióloga, Mestre em Biotecnologia - Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande, MS, Brasil
brunnabio2008@gmail.com

Danieli Fernanda Buccini

Bióloga, Doutoranda em Biotecnologia - Universidade Católica Dom Bosco Campo Grande, MS, Brasil
dfbuccini@gmail.com

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o interesse da comunidade científica no conhecimento e controle dos agentes de poluição ambiental tem aumentado substancialmente. Interesse esse que foi intensificado com o constante crescimento da população mundial e o conseqüente aumento da industrialização, incrementando a ação antrópica sobre os recursos naturais (VELMA *et al.*, 2009). Nessa perspectiva, ambientes aquáticos como rios, estuários, lagoas e oceanos, principalmente próximos às cidades, recebem de forma crescente, inúmeros compostos xenobióticos como resultado da atividade antropogênica. Tal fato está intimamente ligado à redução da qualidade ambiental, bem como ao comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (ARIAS *et al.*, 2007; HAYASE *et al.*, 2009).

As concentrações de poluentes na água geralmente dependem de fenômenos provocados pela chuva e drenagem da água por sistemas de irrigação (ERGENE *et al.*, 2007b; ROSSI, 2008). Organismos aquáticos acumulam esses poluentes diretamente da água contaminada ou indiretamente através da ingestão de outros organismos contaminados. Desse modo, substâncias genotóxicas podem contaminar tanto os organismos aquáticos do ecossistema, como também outros seres vivos por meio da cadeia alimentar, com conseqüências futuras imprevisíveis (BERTI *et al.*, 2009; GRISOLIA *et al.*, 2009).

Uma abordagem integrada do biomonitoramento, incluindo os diferentes bioindicadores, e da avaliação dos diferentes parâmetros genéticos permite uma avaliação confiável do impacto da exposição de poluentes em diferentes ecossistemas (BOLOGNESI *et al.*, 2006). A utilização de biomarcadores nesses ecossistemas não só evidenciam os impactos de

atividades negativas sobre o ambiente, mas também a ausência de influências antropogênicas em determinadas regiões (GORBI *et al.*, 2008).

Compreender a influência de produtos químicos sobre a integridade do material genético dos seres vivos é fundamental para melhorar a aplicabilidade dos ensaios e testes de genotoxicidade como forma de biomonitoramento (HARA *et al.*, 2009).

Trabalhos com genotoxicidade em peixes são considerados uma importante ferramenta na avaliação da qualidade da água, efeitos de poluentes e ação antrópica sobre organismos aquáticos. Assim, com o intuito de reduzir os riscos aos seres vivos e ao ambiente, inúmeras técnicas têm sido utilizadas em pesquisas para identificar o potencial efeito genotóxico de substâncias ou alterações nos ecossistemas, com especial interesse nos organismos aquáticos, considerados excelentes indicadores biológicos, uma vez que esses são sensíveis a alterações em ambientes (BUCKER *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; HOVHANNISYAN, 2010).

Atualmente o teste do micronúcleo é bastante utilizado para detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos, onde o micronúcleo é correspondente a um núcleo supranumerário visível por microscopia óptica no citoplasma de uma célula, e tem sido empregado em laboratório como ensaio de genotoxicidade de compostos químicos presentes na água (AYOOLA *et al.*, 2012; SCHNELL *et al.*, 2013; FUZINATTO *et al.*, 2013). A incidência de micronúcleos serve como um indicador do índice de danos no DNA. A avaliação é feita por meio de contagem de micronúcleos na amostra estudada, sendo essa rápida, menos exigente tecnicamente e com alto grau de confiabilidade (FLORES e YAMAGUCHI, 2008). Este teste é empregado para estudos de análises ambientais, onde muitos trabalhos

utilizam peixes, pela sensibilidade desses organismos, às mudanças ambientais ou agentes químicos dispersos na água (ABDEL-GAWAD *et al.*, 2010).

Peixes do gênero *Astyanax* são bastante utilizados para consumo humano, possuem um grande valor ecológico como espécie forrageira e são também considerados transformadores de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez deverá alimentar aves e peixes pertencentes a outros níveis tróficos. Sua utilização como forma de biomonitoramento em diferentes cursos hídricos, é uma ferramenta de fácil aplicação devido a sua ampla distribuição (TRUJILLO-JIMÉNEZ *et al.*, 2014; RAMSDORF *et al.*, 2012; ERBE *et al.*, 2011).

O córrego Ceroula está situado no município de Campo Grande, MS, e pertence à área de preservação permanente (APP). Atualmente a ocupação em suas margens é evidenciada pela construção e pelo cultivo de subsistência, podendo ser detectada a fragmentação da vegetação em vários trechos de sua margem (BRONAUT e PARANHOS-FILHO, 2006). Em razão da inexistência de trabalhos com biomonitoramento nas mediações do córrego Ceroula, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a genotoxicidade em lambaris (*Astyanax* sp.) em 2 áreas do córrego Ceroula, com caracterizações distintas, em Campo Grande, MS. Também foi conduzido bioensaio com herbicida para verificar o efeito desse composto no material genético da espécie estudada e comparar com dados encontrados nos espécimes do córrego.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das Amostras Biológicas

Diante da ampla distribuição e relativa abundância, foram utilizados 15 indivíduos de

Lambaris (*Astyanax* sp.), por data de coletas realizadas em duas áreas do córrego Ceroula situado em Campo Grande, MS, (Área 1 (A1): S 20° 22' 19" W 54° 33' 57" e Área 2 (A2): S 20° 22' 47" W 54° 39' 27"). As duas áreas se encontram a aproximadamente 3 km de distância uma da outra. Foram realizadas três repetições de coleta do sangue periférico durante o ano em diferentes dias, para posterior análise que foi realizada no laboratório de Farmacologia e Mutagênese/Bio-Saúde/UCDB. Os exemplares foram coletados por meio de varas de pesca específicas para lambaris e acondicionados em recipiente com água, devidamente aerados. A amostra de sangue de cada indivíduo foi coletada ainda no local, pelo método de decapitação e feito o esfregaço na lâmina de vidro, para análise da frequência de eritrócitos micronucleados e alterações morfológicas no núcleo das células.

Para os ensaios em sistema controlado foram utilizados também 15 indivíduos de *Astyanax* sp. obtidos em piscicultura e do mesmo modo, foi feito o esfregaço de

sangue periférico, ainda na piscicultura, sem a realização de experimento em laboratório. Após a coleta os animais foram acondicionados em sacos plásticos identificados e armazenados em freezer para posterior incineração.

Bioensaio

Foram utilizados 30 indivíduos de *Astyanax* sp. obtidos em piscicultura e acondicionados em aquários de 40 litros a cada 15 indivíduos, em condições de laboratório. Quinze indivíduos foram utilizados em experimento com exposição a 1500 µg/L de glifosato, adaptado de doses utilizadas por Rossi (2008). Os indivíduos expostos ao glifosato foram eutanasiados após 24, 48 e 72 horas (cinco animais por tempo de estudo), para realização de esfregaço e análise da genotoxicidade por meio do teste do micronúcleo. Outros 15 indivíduos foram utilizados para coleta de sangue sem a exposição ao agrotóxico, e eutanasiados nos mesmos tempos descritos anteriormente, para obtenção do sangue e análise de eritrócitos

micronucleados e núcleos morfológicamente alterados, para posterior relação com os peixes coletados no córrego Ceroula. Após a coleta os animais foram acondicionados em sacos plásticos identificados e armazenados em freezer para posterior incineração. O protocolo acima foi devidamente apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica Dom Bosco, sob o número 048/2008A.

Teste de Micronúcleos

Após a captura dos peixes, foi retirado o sangue por método de decapitação e realizado o esfregaço, com secagem do material por 12 horas e coloração com Giemsa. Para a avaliação do potencial genotóxico, a frequência de eritrócitos micronucleados (MN) e núcleos morfológicamente alterados (NMA) foram avaliados pela contagem de 3000 células por indivíduo. A confecção das lâminas e a contagem foram realizadas pelo procedimento duplo-cego, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (NIKON ECLIPSE E-200) em objetiva

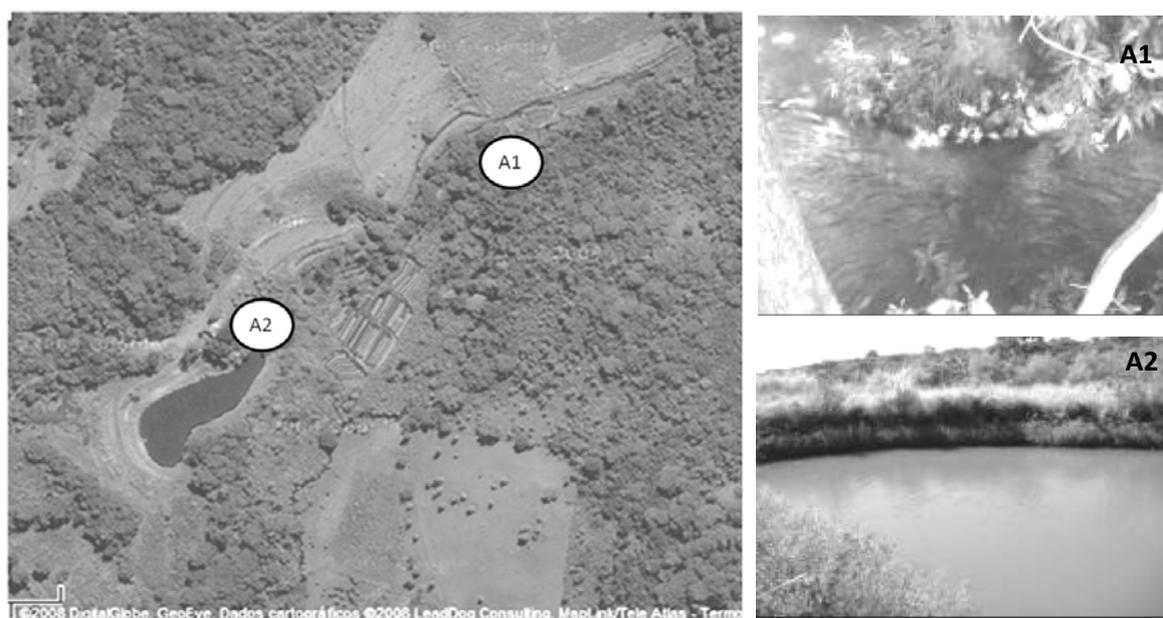


Figura 1: Imagem de satélite do córrego Ceroula e foto mostrando as duas áreas de estudo. A1: foto ilustrativa da área 1 (A1). A2: foto ilustrativa da área 2 (A2). Fonte: Imagem Satélite Google Maps (<http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=w>). Acesso em 13/11/2008.

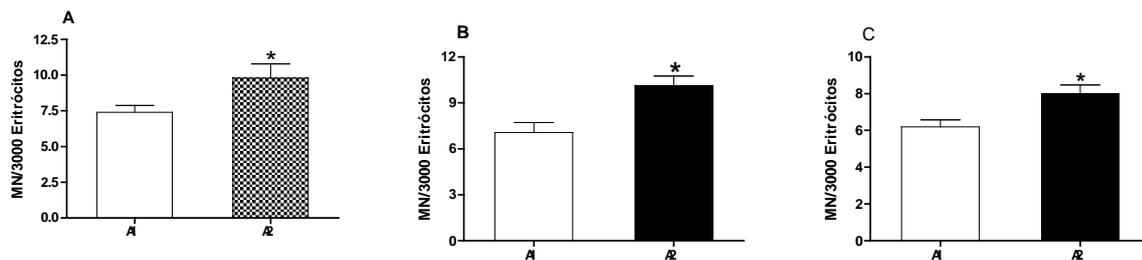


Figura 2: Número de Micronúcleos (MN)/3000 eritrócitos analisados em diferentes datas de coleta nas duas áreas do córrego Ceroula. Os peixes coletados com vara e pesca específica para lambari (n=15) na Área 1 (A1) e Área 2 (A2). Painel A: primeira coleta realizada na segunda quinzena de maio de 2008 na A1 e A2 no córrego Ceroula. Painel B: segunda coleta realizada agosto de 2008 na A1 e A2 no córrego Ceroula. Painel C: terceira coleta realizada em setembro de 2008 na A1 e A2 no córrego Ceroula. Foram comparados os números de micronúcleos (coloração de Giemsa a 5%). Resultados expressos como média + EPM do número de micronúcleos por 3000 eritrócitos. *p<0,05 comparado as duas áreas do córrego (teste t de Student).

de imersão (10x100).

Análise Estatística

Nos casos de diferentes grupos, o teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as diferenças entre eles. Em todos os casos, comparações individuais foram testadas teste de Bonferroni (comparações múltiplas)

ou teste t de Student (comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. Os resultados foram expressos como média ± EPM e o $\alpha = 0,05$.

Resultados

A área 1 (A1: S 20° 22' 19" W 54° 33' 57"), corresponde a uma parte do córrego Ceroula, com

presença de mata ciliar residual e ausência da prática de agricultura em seu entorno. A área 2 (A2: S 20° 22' 47" W 54° 39' 27"), correspondente a uma outra parte do córrego que se encontra represado formando uma lagoa permanente, com ausência de mata ciliar, e vegetação do seu entorno constituída de gramíneas, com práticas de agricultura no local. A água do córrego possui o fluxo na

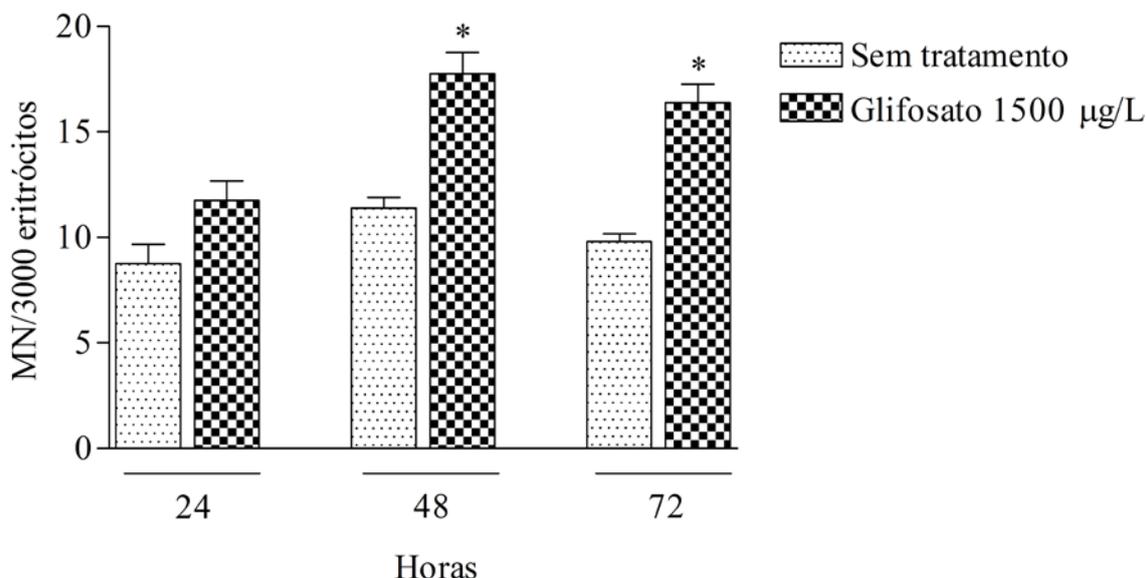


Figura 3: Número de Micronúcleos (MN) em bioensaio com diferentes horas de exposição com Glifosato 1500 µg/L e sem Glifosato em aquários experimentais. Os peixes lambari (*Astyanax* sp.) submetidos em aquário com 40 L de água e exposição do glifosato (1500 µg/L) e aquários sem Glifosato (n= 15) e coletados amostra de sangue, respectivamente por 24 horas, 48 horas e 72 horas (n=5 indivíduos a cada hora de coleta). Foram comparados os números de micronúcleos (coloração de Giemsa a 5%). Resultados expressos como média + EPM do número de micronúcleos por 3000 eritrócitos. *p<0,05 comparado com os demais grupos. (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

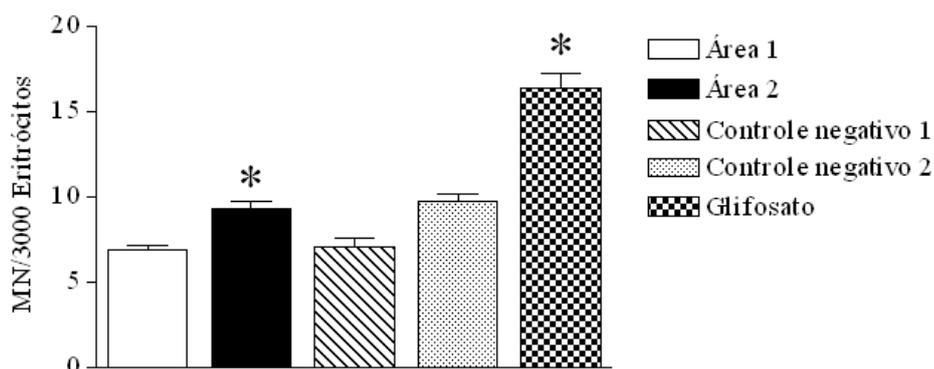


Figura 4 - Número de Micronúcleos (MN) nas duas áreas do córrego e diferentes controles. Os peixes coletados com vara e pesca específica para lambari (n=15) na área 1 (A1) e área 2 (A2). Os lambaris coletados em piscicultura, não receberam tratamento (n=15) correspondente ao controle negativo 1. Peixes submetidos a aquários experimentais com 40 l de água sem tratamento algum, como controle negativo 2 (n=5) com coleta de sangue após 72 horas no aquário. Peixes tratados com de Glifosato (1500 µg/L) em 72 horas de exposição (n=5). Foram comparados os números de micronúcleos (coloração de Giemsa a 5%). Resultados expressos como média + EPM do número de micronúcleos por 3000 eritrócitos. *p<0,05 comparado com os demais grupos. (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

direção da A1 para A2 (Figura 1).

Para obtenção da amostragem apresentada no presente estudo, não foram encontradas dificuldades na coleta dos indivíduos nas duas áreas do córrego, em todas as datas de coleta, o gênero *Astyanax* foi bastante abundante nas duas áreas do córrego (Figura 1). O número total de indivíduos coletados durante o ano foi de 45 indivíduos em cada área do córrego, sendo considerado um número amostral adequado para esse estudo.

Foram observadas diferenças estatísticas significativas, na presença de micronúcleos encontrados, quando comparado as duas áreas do córrego, onde a A2 apresentou indivíduos com maior frequência de eritrócitos micronucleados em relação a A1 (Figura 2: painéis A, B e C e Figura 6, painel B).

O bioensaio com a exposição do lambari (*Astyanax* sp.) ao herbicida glifosato, por diferentes períodos de tempo, teve como intuito caracterizar a presença de micronúcleos (MN) e núcleos morfológicamente alterados (NMA) em eritrócitos de peixe, induzida por esse composto, para posterior comparação com os animais coletados no córrego Ceroula. Os

resultados obtidos demonstram que após 24 horas da exposição ao glifosato, os peixes não apresentaram aumento no número de micronúcleos, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, após 48 e 72 horas, houve aumento significativo na frequência de eritrócitos micronucleados, em relação ao grupo não exposto ao glifosato (Figura 3 e Figura 6, painel B).

Na figura 4 estão representados os resultados referentes à média de micronúcleos das três coletas nas áreas 1 e 2 do córrego Ceroula, os resultados da exposição dos animais ao glifosato (72 horas) e seu respectivo controle (controle negativo 2). Também estão expressos os resultados obtidos após avaliação de peixes de piscicultura, não mantidos em ambientes de laboratório. Os resultados obtidos demonstram que a A2 apresentou aumento significativo no número de micronúcleos quando comparado aos grupos controle (1 e 2) e em relação à A1. Porém os animais da A2 apresentaram número de micronúcleos inferiores àqueles observados nos peixes expostos ao glifosato.

Com o objetivo de confirmar os dados referentes à

genotoxicidade obtidos com o teste de micronúcleos, foram avaliados em todos os animais, os números de núcleos morfológicamente alterados (NMA) (Figura 6, painel A). Os resultados corroboram os obtidos com a avaliação de micronúcleos (Figura 5), onde os animais coletados na A2 apresentaram maior frequência de NMA, em relação à A1 e controles negativos. Do mesmo modo, a exposição ao glifosato por 72 induziu o aumento significativo dos NMA em relação aos demais grupos analisados.

DISCUSSÃO

Pesquisas de genotoxicidade em peixes demonstram a importância desses organismos como bioindicadores ambientais, avaliando riscos aos ecossistemas, onde estudos têm destacado o uso do micronúcleo como teste de avaliação do impacto da presença de agentes químicos na água ou danos ambientais e seus efeitos na integridade do DNA de peixes (NORMANN *et al.*, 2008; GALINDO *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos demonstram que A2 em comparação com A1 apresentou peixes com aumento estatisticamente significativo no

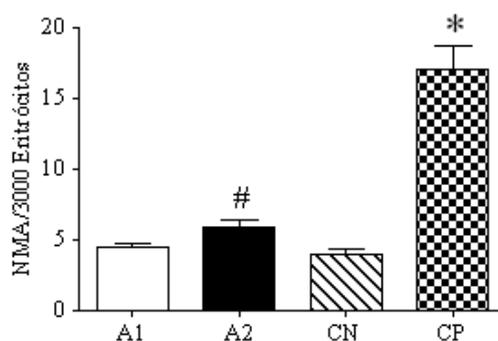


Figura 5 - Número de núcleos morfológicamente alterados (NMA) nas duas áreas do córrego e diferentes controles. Os peixes coletados com vara de pesca específica para lambari (n=15), na Área 1 (A1) e Área 2 (A2). Os lambaris coletados em piscicultura, não receberam tratamento (n=15) correspondente ao controle negativo (CN). Peixes tratados com de Glifosato (1500 µg/L) em 72 horas de exposição (n= 5), como controle positivo (CP). Foram comparados os números de micronúcleos (coloração de Giemsa a 5%). Resultados expressos como média + EPM do número de núcleos morfológicamente alterados (NMA) por 3000 eritrócitos. *p<0,05 comparado com os demais grupos e #p<0,05 comparando A1 e A2 (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

número de eritrócitos micronucleados, possivelmente devido às características observadas nas duas áreas do córrego. O fluxo da água no córrego Ceroula é de A1 para A2, de modo que detritos potenciais contaminantes fluem nesta direção de A1 para A2. Aliado ao fato de que A2 demonstra ter uma maior atividade antrópica e ausência de mata ciliar, isso pode explicar o aumento de eritrócitos micronucleados e alterações no núcleo em peixes dessa área. Segundo Padovesi-Fonseca *et al.* (2010), as práticas antropogênicas podem alterar o ambiente como, por exemplo, agricultura intensiva, atividade agropecuária, elevado consumo de insumos ferti-sanitários, pouca presença de cobertura vegetal nas margens dos cursos

d'água, poderá apresentar condições favoráveis ao processo de contaminação e poluição das águas superficiais.

Poluentes na água podem induzir a danos no DNA de organismos aquáticos, e trabalhos que visem verificar a ação desses compostos, como forma de biomonitoramento é de grande relevância (ALI *et al.*, 2008; FEDATO *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2010), sendo que, agentes agrotóxicos são grandes precursores de danos em cursos d'água no Brasil, onde a maioria dos agricultores possuem e necessidade da utilização de herbicidas para controle de pragas e de ervas daninha (MATUS *et al.* 2013).

O herbicida escolhido para realização do ensaio visando

mimetizar a exposição dos peixes a agrotóxicos na água, foi o glifosato, sendo esse o de maior uso no estado de Mato Grosso do Sul. Observando a genotoxicidade desse composto podemos confirmar a importância de avaliar riscos ambientais relacionados aos produtos utilizados nas práticas de agricultura que podem alcançar os cursos d'água, posto que, segundo Azevedo-Santos *et al.* (2010), a poluição dos ecossistemas aquáticos pode provocar prejuízos à biodiversidade, implicando na diminuição ou desaparecimento de populações locais e até mesmo introdução de novas espécies.

Com objetivo de comparar os dados coletados no córrego com dados confirmados de mutagenicidade de compostos na

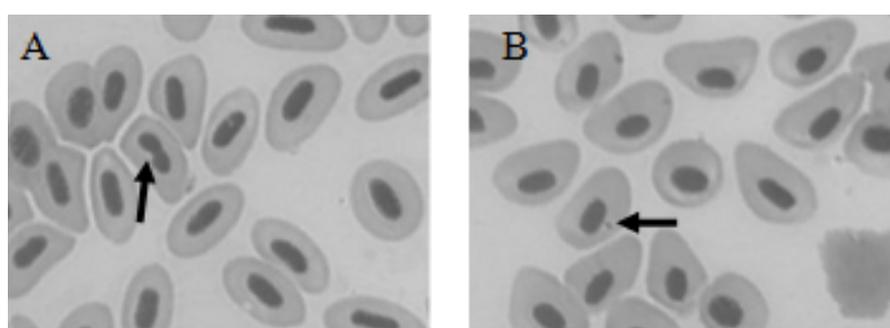


Figura 6 - Foto ilustrando o núcleo morfológicamente alterado (NMA) e eritrócito micronucleado. A: eritrócito com núcleo morfológicamente alterado (NMA). B: eritrócito micronucleado. Microscopia óptica, aumento 1000X.

água, o uso do bioensaio realizado nesse trabalho permitiu estudar os efeitos genotóxicos do herbicida glifosato de forma isolada, minimizando a influência das variáveis ambientais, sob condições controladas em laboratório. Os resultados obtidos pelo bioensaio não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente estudado, mas auxilia no fornecimento de uma base de dados visando um melhor entendimento dos fatores que estão interferindo na saúde dos organismos e alterando as condições ambientais.

O glifosato é um herbicida utilizado para remoção de plantas daninhas em práticas de agricultura, sendo o mais utilizado no mundo por ser considerado um composto pouco tóxico para animais, porém há controvérsias quanto aos limites toleráveis de glifosato na água e no solo (AMARANTE-JUNIOR *et al.*, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2011). Em trabalho realizado com o mesmo herbicida, Çavas e Könen (2007) analisaram danos no DNA do peixe *Carassius auratus*, em diferentes dias de exposição, concluindo que os peixes são sensíveis para testar produtos químicos demonstrando a importância de mais investigação da genotoxicidade do glifosato. Chapadense *et al.* (2009), usando outro herbicida, constataram que as alterações nas frequências dos micronúcleos apresentam características clastogênicas, podendo induzir a eventos mutagênicos na espécie estudada por eles *Colossoma macropomum* (tambaqui). Esses trabalhos demonstram a sensibilidade em exposição a agentes genotóxicos em peixes de diferentes espécies e a importância dessa avaliação, já que o grau de genotoxicidade também é considerada controversa (ALVAREZ-MOYA *et al.*, 2011; CEREGATTI *et al.*, 2013). E espécies do gênero *Astyanax* já foram utilizadas em estudos de genotoxicidade, como *Astyanax fasciatus*, demonstrando ser bons biomarcadores para avaliação de contaminantes em

cursos d'água (ZENKNER *et al.*, 2013).

Pesquisadores constataram em seus trabalhos que fontes de contaminação nas águas superficiais muitas vezes são de produtos suposta ou parcialmente tratados, sendo que descargas das indústrias químicas, petroquímicas indústrias, refinarias de petróleo, os derramamentos de petróleo, fábricas de laminagem de aço, esgotos domésticos não tratados e os pesticidas estão entre atividades de impactos no ambiente, nos organismos aquáticos e na qualidade da água, enfatizando ainda a importância de uma avaliação com ensaios que devem ser incluídos como parâmetros adicionais na avaliação da qualidade da água e acompanhamento de programas de biomonitoramento (OHE *et al.* (2004); MACEDO e SIPAÚBA-TAVARES, 2010). Podemos ainda observar em um estudo feito por Dhillon *et al.* (2011) que uma série de variáveis que podem provocar danos irreversíveis ao material genético e consequentemente mutações, podendo ocasionar doenças como o câncer em longo prazo em diversas espécies incluindo o ser humano.

Trabalhos desse tipo são sensíveis e confiáveis para a detecção de atividades de compostos mutagênicos no meio aquático, e demonstram que danos no material genético das espécies podem levar à diminuição da biodiversidade devido à diminuição no processo de reprodução, indução de anormalidades nucleares, câncer, alterações histopatológicas, dentre outros impactos ainda desconhecidos (ERGENE *et al.*, 2007b; SPIVAK *et al.*, 2009; SCALON *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a importância da preservação das áreas das matas ao longo dos cursos d'água, e os cuidados com a utilização de compostos químicos em seu entorno, posto que o número de compostos presentes na

água está diretamente ligado com a qualidade da mesma, e esses cuidados são de suma importância para preservação da biodiversidade, (BORTOLUZZI *et al.*, 2006; NUNES e PINTO, 2007) onde não só nos centros urbanos, mas também na área rural, existem poluentes que afetam a biota aquática (ZENKNER *et al.*, 2013; MATUS *et al.*, 2013).

Nessa perspectiva, podemos concluir que espécies de peixes do gênero *Astyanax*, podem ser utilizado como bioindicador em trabalhos com genotoxicidade como forma de biomonitoramento em cursos d'água, e que trabalhos dessa natureza são importantes para preservação da biodiversidade, fundamentando os programas e estratégias de recuperação e preservação de bacias hidrográficas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GAWAD, F. K. H.; EL-SEEHY, M. A.; EL-SEEHY, M. M. Clastogenicity in fish genome and aquatic pollution. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, Giza, v.2, n.4, p.335-342, 2010.
- ALI, F. K. H.; EL-SHEHAWI, A. M.; SEEHY, M. A. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. **African Journal of Biotechnology**, Cairo, v.7, n.5, p.606-612, 2008.
- AMARANTE-JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Luis, v.25, n.4, p.589-593, 2002.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIREI, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.12, n.1, p.61-72, 2007.

- AZEVEDO-SANTOS, V. M.; COSTA-NETO, E. M.; LIMA-STRIPARI, N. Concepção dos pescadores artesanais que utilizam o reservatório de Furnas, Estado de Minas Gerais, acerca dos recursos pesqueiros: um estudo etnoictológico. **Biotemas**, Passos-MG, v.23, n.4, p.135-145, 2010.
- ALVAREZ-MOYA, C.; SILVA, M. R.; ARÁMBULA, A. R. V.; SANDOVAL, A. I.; VASQUEZ, H. C.; MONTES, R. M. G. Evaluation of genetic damage induced by glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia bioassays*. **Genetics and Molecular Biology**, Nogales, v.34, n.1, p.127-130, 2011.
- AYOOLA SO, BASSEY BO, ALIMBA CG, AJANI EK. Textile effluent induced genotoxic effects and oxidative stress in *Clarias gariepinus*. **Pak J Biol Sci**. v.1, n.15(17):804-12, 2012.
- BERTI, A. P.; DÜSMAN, E.; SOARES, L. C.; GRASSI, L. E. A. Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. **Revista de Saúde e Biologia**, Maringá, v.4, n.1, p.45-51, 2009.
- BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; SCIUTTO A. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study. **Marine Environmental Research**, Genoa, v.62, p.287-291, 2006.
- BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; CELSO, S.; GONÇALVES, C. S.; JOÃO, B. R.; PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.10, n.4, p.881-887, 2006.
- BRONAUT, R. P. M.; PARANHOS-FILHO, A. C. Avaliação do uso de imagens de satélite Landsat Etm+ na identificação e monitoramento das áreas de preservação permanente ao longo dos corpos hídricos. In: 1º SIMPÓSIO DE GEOTECNOLOGIAS NO PANTANAL, Campo Grande-MS, 2006. **Anais...** Campo Grande-MS: Embrapa Informática Agropecuária/INPE, 2006. p.431-437.
- BUCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposto ao benzeno. **Acta Amazonica**, Manaus, v.36, n.3, p.357-364, 2006.
- ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, Turkey, v.22, n. 4, p. 63-268, 2007.
- CHAPADENSE, P. F. G.; CASTRO, F. J.; ALMEIDA, J. Al.; MORON, S. E. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Araguaína, v.10, n.2, p.398-405, 2009.
- CEREGATTI, M. G.; BIOLCHI, M.; PEREIRA, L. M. A.; CASA, M. S.; OLIVEIRA, A.; ABIDO, L. H. C.; MOREIRA, M. C. S.; LIPOSKI, D.; VOGEL, C. I. G. Análise de genotoxicidade em peixes nos rios do sistema aquífero Guarani. **Revista UNIPLAC**, v. 1, n. 1, 2013.
- DHILLON, V. S.; THOMAS, P.; IARMARCOVAI, G.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; FENECH, M. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, Oxford, v.26, n.1, p.33-42, 2011.
- ERBE MC, RAMSDORF WA, VICARI T, CESTARI MM. Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**. v.20, n.2, p.320-8, 2011.
- ERGENE, S.; ÇELIK, A.; ÇAVAŞ, T.; KAYA, F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environment International**, Turkey, v.33, p.877-885, 2007b.
- FEDATO, R. P.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. **Mutation Research**, Londrina, v.700, p.80-85, 2010.
- FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v.1, n.3, p.337-340, 2008.
- FUZINATTO CF, FLOHR L, MELEGARI SP, MATIAS WG. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.;98, p.103-9, 2013.
- GALINDO, T.; SILVA, E.; ROSÁRIO, I. Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de *Bathygobius saporator* (valenciennes, 1837) (teleostei, gobiidae) no litoral de salvador (BA), Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, Portugal, v.16, n.1, p.1-7, 2012.
- GORBI, S.; LAMBERTI, C.V.; NOTTI, A.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; MOLTEDO, G.; REGOLI, F. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. **Marine Environmental Research**, Roma, v.65, p.34-49, 2008.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L.G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake.

Genetics and Molecular Biology, v.32, n.1, p.138-143, 2009.

HARA, R. V.; LOPES, B. P. V.; SANTOS, F. P.; OLIVEIRA, R. J. Aplicabilidade de ensaios da genética toxicológica no biomonitoramento de ambientes aquáticos e promoção da saúde humana. **Revista Terra e Cultura**, Filadélfia, n.48 e 49, p.20-25, 2009.

HAYASE, D.; HORAI, S.; ISOBE, T.; MILLER, T. W.; TAKAHASHI, S.; OMORI, K.; TANABE, S. Monitoring Trace Elements in Coastal Waters Using Sardine as a Bioindicator. **Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry**, Japão, p.167-175, 2009.

HOVHANNISYAN, G. G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Hovhannisyan Molecular Cytogenetics**, Yerevan, v.3, n.1, p.1-11, 2010.

MACEDO, C. F.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.36, n.2, p.149-163, 2010.

MATUS, E. M.; PERAZZO, G. X.; VIEIRA, L. C.; LORO, V. L. Avaliação da Genotoxicidade em *Hoplias malabaricus* Expostas Agentes Agrotóxicos na Barragem da Unipampa, Uruguaiana, RS, Brasil. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 5, n. 2, 2013.

MARTÍNEZ-GÓMEZ C.; VETHAAK, A. D.; HYLLAND, K.; BURGEOT, T.; KÖHLER, A.; LYONS, B. P.; THAIN, J.; GUBBINS, M. J.; DAVIES, I. M. A guide to toxicity assessment and

monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters.

Journal of Marine Science, Amsterdam, v.67, p.1105-1118, 2010.

NORMANN, C. A. B. M.; MOREIRA, J. C. F.; CARDOSO, V. V. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecostomus* exposed to potassium dichromate. **African Journal of Biotechnology**, Porto Alegre, v.7, n.7, p.893-896, 2008.

NUNES, F. P.; PINTO, M. T. C. Conhecimento local sobre a importância de um reflorestamento ciliar para a conservação ambiental do alto São Francisco, Minas Gerais. **Biota Neotropica**, Belo Horizonte, v.7, n.3, p.171-179, 2007.

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

PADOVESI-FONSECA, C.; CORRÊA, A. C. G.; LEITE, A. F. M. L.; JOVELI, J. C.; COSTA, L. S.; PEREIRA, S. T. Diagnóstico da sub-bacia do ribeirão Mestre d' Armas por meio de dois métodos de avaliação ambiental rápida, Distrito Federal, Brasil Central. **Revista Ambiente & Água**, Taubaté, v.5, n.1, p.43-56, 2010.

QUEIROZ, G. M. P.; SILVA, M. R.; BIANCO, R. J. F. Transporte de Glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em solo agrícola. **Química Nova**, Blumenau, v.34, n.2, p.190-195, 2011.

RAMSDORF WA, VICARI T, DE ALMEIDA MI, ARTONI RF, CESTARI MM. Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. **Environ Monit Assess**. v.184, n.10, p.5841-9, 2012.

ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e**

Hexaron® em *Astyanax sp.* (Pisces, Teleostei), 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SCALON, M. C. S.; RECHENMACHER, C.; SIEBEL, A. M.; KAYSER, M. L.; RODRIGUES, M. T.; MALUF, S. W.; RODRIGUES, M. A. S.; SILVA, L. B. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Brazilian Journal of Biology**, Novo Hamburgo, v.70, n.4, p.1217-1222, 2010.

SCHNELL S, OLIVARES A, PIÑA B, ECHAVARRI-ERASUN B, LACORTE S, PORTE C. The combined use of the PLHC-1 cell line and the recombinant yeast assay to assess the environmental quality of estuarine and coastal sediments. **Mar Pollut Bull**. v.15, p. 282-9, 2013.

SILVA, J.; SIMEONI, N.; GROFF, A. A.; IANISTCKI, M.; BENVENÚ, V.; SCHRODER, N. T. O ensaio cometa na avaliação da genotoxicidade induzida por poluentes atmosféricos utilizando como biomonitor o moluco *Cantareus aspersus* (Muller, 1774). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Canoas, v.2, n.1, p.45-51, 2007.

SPIVAK, G.; COX, R. A.; HANAWALT, P. C. New Applications of the Comet Assay: Comet-FISH and Transcription-Coupled DNA Repair. **Mutation Research**, Stanford, v.681, n.1, p.44-50, 2009.

TRUJILLO-JIMÉNEZ P, SEDEÑO-DÍAZ JE, LÓPEZ-LÓPEZ E. Assessing the health condition profile in the freshwater fish *Astyanax aeneus* in Champoton River, Mexico. **J Environ Biol**. v.35, n. 1, p.137-45, 2014.

VELMA, V.; VUTUKURU, S. S.; TCHOUNWOU, P. B. Ecotoxicology of Hexavalent Chromium in Freshwater Fish: A Critical Review. **Reviews on Environmental Health**, Mississippi, v.24, n.2, p.129-145, 2009.

ZENKNER, F. F.; AQUINO, T.;
ABLING, F.; DALLEMOLE, D. R.;
KÖHLER, A.; I PRÁ, D.; RIEGER, A.
Avaliação da genotoxicidade do rio
pardinho utilizando o ensaio cometa
em *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819.
Caderno de Pesquisa, série Biologia,
v, 25, n. 3, p. 79-93, 2013.

Recebido em: mar/2012
Aprovado em: mar/2014