



CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA  
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DANOS GENOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS E  
MORFOLÓGICOS EM *Hippocampus reidi* EXPOSTO AO  
PETRÓLEO**

FREDERICO AUGUSTO CARIELLO DELUNARDO

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes

VILA VELHA

2010

FREDERICO AUGUSTO CARIELLO DELUNARDO

**DANOS GENOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS E  
MORFOLÓGICOS EM *Hippocampus reidi* EXPOSTO AO  
PETRÓLEO**

Dissertação apresentada a Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, visando à obtenção do título de Mestre em Ecologia de Ecossistemas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Regina Chippari-Gomes

VILA VELHA

2010

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

D366d Delunardo, Frederico Augusto Cariello.

Danos genotóxicos, matagênicos e morfológicos em *Hippocampus reidi* exposto ao petróleo / Frederico Augusto Cariello Delunardo. – 2010.

78 f. : il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari-Gomes.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Centro Universitário Vila Velha, 2010.

Inclui bibliografias.

1. Cavalo-marinho. 2. Mar – Poluição. 3. Petróleo – Contaminação – Aspectos ambientais. 4. Toxicologia ambiental. I. Chippari-Gomes, Adriana Regina. II. Centro Universitário Vila Velha. III. Título.

000 507 0700

CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA  
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS

**A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado**

**Danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em *Hippocampus reidi*,  
exposto ao petróleo**

Elaborada por

**FREDERICO AUGUSTO CARIELLO DELUNARDO**

Pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, para  
obtenção do título de Mestre em Ecologia.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Dra. Adriana Regina Chippari Gomes**  
(Presidente / Orientador)

---

**Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez**  
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

---

**Dra. Vilma Reis Terra**  
Centro Universitário Vila Velha (UVV)

Vila Velha, 12 de março de 2010

***Aos meus maravilhosos pais, dedico.***

***".... As coisas tangíveis  
tornam-se insensíveis  
à palma da mão.***

***Mas as coisas findas,  
Muito mais que lindas,  
essas ficarão."***

**Carlos Drummond de Andrade**

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Regina Chippari-Gomes, pela amizade, orientação e paciência.

Ao Prof. Dr. Levy, pelo apoio e incentivo.

Ao grande amigo Bruno ferreira, por me transmitir seus conhecimentos com tanta paciência e boa vontade, por estar sempre disponível para me ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

A eterna companheira e melhor amiga Tati, que compartilhando da missão de Biólogo, sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me ajudando incondicionalmente nos bastidores deste projeto.

Ao coordenador do curso de Ecologia e Ecossistemas, Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos, que se tornou um amigo e que muito contribuiu para a conclusão deste trabalho.

A toda equipe do laboratório de Ecotoxicologia Aquática, em especial Celina, Lalá, Michel e Luciano, pela companhia indispensável no dia a dia do laboratório e por estarem presentes nos experimentos.

Aos amigos, Nuam, Delim, Rafa e Aice, por tornarem as aulas de campo momentos inesquecíveis.

Aos amigos de longa data e fundadores da NATIVA – Núcleo de Atividades Ambientais, Ciro, Daniel, Leandro e Joe, que desde o início da graduação me incentivaram a trilhar os rumos da pesquisa científica.

A todos os professores do curso de Ecologia de Ecossistemas pelos ensinamentos transmitidos em sala de aula ou em campo, e pelas conversas informais, tão ricas em sabedoria e conhecimento.

A todos os funcionários do complexo Biopráticas, em especial ao Paulo Roberto e João Damaceno do laboratório de microbiologia, pela boa vontade em auxiliar um amigo pesquisador.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Marisa Narciso Fernandes, por abrir as portas do seu laboratório e confiar a mim a utilização de seus equipamentos.

Aos pesquisadores do LZBC (Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa) da UFSCar, Iara Souza, Marcelo G. Paulino e Helen Sadaukas, por se mostrarem pessoas tão receptivas e por me ensinarem tanta coisa em tão pouco tempo, com muita atenção e entusiasmo.



## LISTA DE FIGURAS

### I CAPÍTULO

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 1</b> | Exemplar de <i>Hippocampus reidi</i> utilizados no experimento..... | 24 |
|-----------------|---|----|

### II CAPÍTULO

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 1</b> | Aquário de aclimatação (40L) dos exemplares de <i>Hippocampus reidi</i> . | 38 |
|-----------------|---|----|

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 2</b> | Aquários testes com capacidade de 3L nos quais os exemplares de <i>Hippocampus reidi</i> foram expostos ao petróleo ( $10\text{mL.L}^{-1}$ ) acompanhados do grupo controle. n=8..... | 39 |
|-----------------|---|----|

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 3</b> | Momento da contaminação dos aquários testes com $10\text{mL.L}^{-1}$ de petróleo..... | 39 |
|-----------------|---|----|

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 4</b> | Momento da punção caudal do sangue de um exemplar de <i>Hippocampus reidi</i> ..... | 41 |
|-----------------|---|----|

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Figura 5</b> | Eritrócitos de um exemplar de <i>Hippocampus reidi</i> com a presença de micronúcleos..... | 42 |
|-----------------|--|----|

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 6</b> | Ensaio Cometa: (A) classe de dano nível 0; (B) classe de dano de nível 1; (C) classe de dano nível 2..... | 44 |
|-----------------|---|----|

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Figura 7</b> | Freqüência de micronúcleos em eritrócitos de <i>Hippocampus reidi</i> expostos à concentração de petróleo de $10\text{mL.L}^{-1}$ em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h, e seus respectivos grupos controles. Além do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem o contaminante por 7 dias, e seu respectivo grupo controle. * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle com $p<0,05$ . A caixa representa a amplitude interquartil que contém 50% dos valores. Linhas externas (na vertical) correspondem aos maiores e menores valores encontrados e linhas internas (horizontal) correspondem à mediana..... | 48 |
|-----------------|--|----|

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Figura 8</b> | <b>Figura 8.</b> Freqüência do Índice de Danos no DNA em eritrócitos de <i>Hippocampus reidi</i> expostos ao petróleo na concentração de $10\text{mL.L}^{-1}$ em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h e seus respectivos grupos controles. Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. * indica diferença em relação ao grupo controle com $p<0,05$ . Os dados estão apresentados em Média $\pm$ Erro Padrão da Média..... | 51 |
|-----------------|--|----|

- Figura 9** Frequência do Índice de Danos no DNA em eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> por 96h e do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem o contaminante por 7 dias, e seus respectivos grupos controles. Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. \* indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,05. Os dados estão apresentados em Média ± Erro Padrão da Média..... 52
- Figura 10** Histopatologias branquiais encontradas em *Hippocampus reidi* exposto ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup>. **(A)** Estrutura normal da brânquia; **(B)** Fusão das lamelas; **(C)** Hipertrofia das células pavimentosas do epitélio lamelar; **(D)** Descolamento epitelial; **(E)** Hiperplasia lamelar; **(F)** Congestão vascular..... 56
- Figura 11** **(A)** Valores médios de alteração (VMA) e **(B)** índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h, e seus respectivos grupos controles. Além do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem o contaminante por 7 dias, e seu respectivo grupo controle. Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. \* indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,05; \*\* indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,01..... 58

## LISTA DE TABELAS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tabela 1</b> | Listagem dos tipos de histopatologias mais freqüentes em brânquias de peixes.....  | 46 |
| <b>Tabela 2</b> | Efeitos genotóxicos do petróleo, através do ensaio cometa, observados nos eritrócitos de <i>Hippocampus reidi</i> expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L <sup>-1</sup> em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h e seus respectivos grupos controles. Além do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem contaminante por 7 dias e seu respectivo grupo controle.....   | 53 |
| <b>Tabela 3</b> | Freqüência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de <i>Hippocampus reidi</i> expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L <sup>-1</sup> em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h, e seus respectivos grupos controles. Além do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem o contaminante por 7 dias, e seu respectivo grupo controle. Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. * indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,05; ** indica diferença entre o grupo exposto de 96h e o grupo do experimento de recuperação com p<0,05. Os dados estão apresentados em Média ± Erro Padrão da Média..... | 57 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA = do Inglês Analysis of Variance (Análise de variância)

BTEX = Benzeno, Tolueno, EtilBenzeno e Xileno

DMSO = do Inglês Dimethyl Sulfoxide acid ( Dimetil sulfóxido)

DNA = do inglês Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)

EDTA = do Inglês Ethylene Diamene Tetra-Acetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

IEMA = Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos

MN = Micronúcleo

PAH = do Inglês Polycyclic aromatic hidrocarbon (Hidrocarboneto Policíclico Aromático)

UVV = Centro Universitário Vila Velha

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é constituída de dois capítulos.

No primeiro capítulo foi realizada uma revisão de literatura abordando os principais assuntos discutidos nesta dissertação.

O segundo capítulo refere-se aos danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos observados em *Hippocampus reidi*, causados pela exposição aguda e sub-crônica ao petróleo (óleo cru).

## SUMÁRIO

### I CAPÍTULO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>REVISAO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                   | <b>14</b> |
| 1.1      | POLUIÇÃO AQUÁTICA E CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO                       | 14        |
| 1.2      | ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS.....                                       | 15        |
| 1.3      | O USO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....               | 15        |
| 1.4      | BIOMONITORAMENTO COM PEIXES.....                                    | 17        |
| 1.5      | DANOS CAUSADOS PELOS COMPOSTOS QUÍMICOS E DANOS NO DNA.....         | 18        |
| 1.6      | TESTE DO MICRONÚCLEO.....   | 19        |
| 1.7      | ENSAIO COMETA.....  | 21        |
| 1.8      | HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS.....                                    | 22        |
| 1.9      | CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE TESTE: <i>Hippocampus reidi</i> ..... | 23        |
| <b>2</b> | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>26</b> |

### II CAPÍTULO

|          |                                |           |
|----------|--------------------------------|-----------|
|          | <b>RESUMO.....</b>             | <b>33</b> |
|          | <b>ABSTRACT.....</b>           | <b>34</b> |
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>         | <b>35</b> |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b> | <b>37</b> |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1   | ANIMAIS E CONDIÇÕES LABORATORIAIS.....  | 37 |
| 2.2   | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....  | 38 |
| 2.2.1 | <b>Exposição ao petróleo em diferentes períodos – 1ª Etapa.....</b>               | 38 |
| 2.2.2 | <b>Recuperação – 2ª Etapa.....</b>  | 40 |
| 2.3   | CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA DE<br>ACLIMATAÇÃO E DOS EXPERIMENTOS..... | 40 |
| 2.4   | ORIGEM E COMPOSIÇÃO DO PETRÓLEO.....  | 41 |
| 2.5   | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....  | 41 |
| 2.6   | ENSAIO DO MICRONÚCLEO.....  | 42 |
| 2.7   | ENSAIO COMETA.....  | 43 |
| 2.8   | HISTOLOGIA BRANQUIAL.....   | 44 |
| 2.8.1 | <b>Histopatologia .....</b>   | 46 |
| 2.9   | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 46 |
| 3     | <b>RESULTADOS.....</b>  | 47 |
| 3.1   | ANÁLISE DA ÁGUA E MORTALIDADE.....  | 47 |
| 3.2   | EFEITOS MUTAGÊNICOS .....   | 47 |
| 3.2.1 | <b>Teste do Micronúcleo.....</b>  | 47 |
| 3.3   | EFEITOS GENOTÓXICOS.....  | 49 |
| 3.3.1 | <b>Ensaio cometa.....</b>   | 49 |
| 3.4   | EFEITOS MORFOLÓGICOS.....   | 54 |
| 3.4.1 | <b>Histopatologia de Brânquias.....</b>   | 54 |
| 4     | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | 59 |

|          |                                  |           |
|----------|----------------------------------|-----------|
| 4.1      | TESTE DO MICRONÚCLEO.....        | 59        |
| 4.2      | ENSAIO COMETA.....               | 61        |
| 4.3      | HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS..... | 64        |
| <b>5</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b> | <b>68</b> |
| <b>6</b> | <b>REFERÊNCIAS.....</b>          | <b>69</b> |



# I CAPÍTULO

## 1. REVISAO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA E CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO

A descarga deliberada e a liberação acidental de compostos químicos nocivos para o ambiente perturbam a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas naturais. Uma vez que o ambiente aquático é o último destinatário dos poluentes produzidos por fontes naturais e antropogênicas, a acumulação e a persistência dos efluentes industriais no ambiente aquático constituem uma ameaça para a vida (FLEEGER et al., 2003; ÇAVAS E ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

Entre os diversos setores que contribuem para a poluição aquática, as refinarias de petróleo são as mais relevantes para a Ecotoxicologia Aquática (PACHECO E SANTOS, 2001a). O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e compostos orgânicos contendo geralmente enxofre, nitrogênio e oxigênio, além de baixas concentrações de compostos orgânicos, principalmente níquel e vanádio (PEDROZO et al., 2002). Entretanto, a composição química do petróleo é diferente para cada fonte geográfica de extração (OVERTON et al., 2004; WAKE, 2005).

Uma vez presente no ambiente, o petróleo pode passar por diversos processos que envolvem desde a volatilização, hidrólise, fotólise, biodegradação, biotransformação, degradação física e dissolução (PEDROZO et al., 2002). No caso de acidentes envolvendo derramamento de óleo, a maior preocupação ambiental é atribuída principalmente aos componentes polares e de baixo peso molecular como os hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno e xileno) e pequenos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) (INCARDONA et al., 2004; LEE E ANDERSON, 2005; PACHECO E SANTOS, 2001b), que tendem a volatilizar ou solubilizar-se com a água e serem lixiviados para fora da mancha de óleo constituindo a chamada Fração Solúvel do Petróleo (FSP). Esta fração do petróleo é extremamente danosa aos ecossistemas aquáticos uma vez que apresenta alta

toxicidade para os organismos vivos, sendo uma séria ameaça à biodiversidade desses ambientes (SARKAR et al., 2006).

A dimensão do impacto gerado e a velocidade de cada um desses processos variam de acordo com as condições intrínsecas de cada ambiente, tornando-se muito difícil prever acuradamente a dissociação do petróleo e a composição dos subprodutos de degradação, bem como inferir o potencial de toxicidade dos mesmos (PEDROZO et al., 2002).

## 1.2 ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

Para o estabelecimento da condição homeostática dos ambientes naturais é necessário que seja realizado o monitoramento dessas áreas, o que possibilita a tomada de ações corretivas (MONSERRAT et al., 2007). Entretanto, o monitoramento e a avaliação do risco dos ambientes impactados não podem ser baseados exclusivamente em análises químicas de amostras ambientais, uma vez que essas análises não são apropriadas na indicação e predição dos efeitos deletérios causados por contaminantes na biota (BARSIENE et al., 2006, CAJARAVILLE et al., 2000).

Dessa forma, para avaliar os impactos dos poluentes no ambiente é pertinente que sejam mensurados os efeitos que essas substâncias causam nos organismos vivos desses ecossistemas (WELLS et al., 2001). Neste contexto, um grupo apropriado de respostas biológicas, denominados marcadores biológicos ou biomarcadores, pode ser útil para determinar o grau de impacto na biota, além de identificar os estressores ou contaminantes responsáveis por esses efeitos (FUENTES-RIOS et al., 2005).

## 1.3 O USO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou

órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico (LAM E GRAY, 2003).

Em geral, os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição podem ser utilizados para o monitoramento tanto ambiental (exposição ambiental) como biológico (dose de exposição) e são quaisquer alterações biológicas mensuráveis que evidenciem a exposição. Como monitores de efeito, os biomarcadores podem integrar efeitos de múltiplos estressores e auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação. Já os biomarcadores de suscetibilidade permitem identificar grupos de indivíduos mais sensíveis. Os biomarcadores devem, portanto, apresentar elevada especificidade, refletir um único efeito, ser facilmente determinado e apresentar estreita relação dose-efeito (VAN DER OOST et al., 2003).

Entre os numerosos biomarcadores ecotoxicológicos propostos nos últimos anos, aqueles que são baseados na resposta ao nível molecular e celular trazem respostas sobre os primeiros sinais de perturbação ambiental e vêm sendo comumente usados em programas de biomonitoramento (NIGRO et al., 2006). Dentre eles destacam-se: concentrações de cortisol plasmático, atividade das enzimas de detoxificação das fases I e II, como a glutathione S-transferase (GST), enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), formação de anormalidades nucleares (AN), como células binucleadas, núcleo lobado, núcleo segmentado, a presença de micronúcleo e danos no DNA (ensaio cometa) (STEGEMAN et al., 1992; AYLLON E GARCIA-VAZQUEZ, 2000; PACHECO E SANTOS, 2001; VAN DER OOST et al., 2003; ÇAVAS E ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

O uso de biomarcadores medidos ao nível celular ou molecular tem sido proposto como uma ferramenta sensível de alerta para os efeitos biológicos medidos em avaliações da qualidade ambiental (CAJARAVILLE et al., 2000). Como os aspectos comuns entre organismos diferentes se acentuam principalmente ao nível molecular, muitos biomarcadores moleculares possuem a vantagem de poderem ser aplicados a uma ampla variedade de organismos vivos (LAM e GRAY, 2003). Uma das características mais importantes dos biomarcadores de baixa organização biológica

é que sua avaliação antecipa mudanças de maior relevância ecológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema. Antes da morte ou de alterações fisiológicas e morfológicas, os organismos podem responder ao stress, através de alterações moleculares, celulares e etc. (MONSERRAT et al., 2003).

Dessa maneira, os biomarcadores podem ser utilizados de forma preditiva, permitindo que sejam tomadas ações de biorremediação antes que ocorram danos ambientais irreversíveis com conseqüências ecológicas severas (CAJARAVILLE et al. 2000). Estes biomarcadores são de grande importância na avaliação da exposição e dos efeitos de diferentes contaminantes, tais como metais, xenobióticos orgânicos e compostos organometálicos, podendo ser medidos através de diferentes abordagens moleculares (ROSS et al., 2002).

Biomarcadores genéticos têm sido utilizados em diferentes organismos aquáticos para detectar os efeitos de contaminantes ambientais nesses ecossistemas, tais como planárias, moluscos e anfíbios (MÁ et al., 2000; GUECHEVA et al., 2001; PRUSKI E DIXON, 2002; GAUTHIER et al., 2004; PRÁ et al., 2005). Contudo, uma atenção especial tem sido dada em vários estudos utilizando peixes como possíveis monitores biológicos em muitos campos da ciência (BOLIS et al., 2001), incluindo a poluição genotóxica (AL-SABTI E METCALFE, 1995).

#### 1.4 BIOMONITORAMENTO COM PEIXES

Segundo Matsumoto et al. (2006), os peixes podem acumular poluentes diretamente da água contaminada ou indiretamente através da ingestão de alimentos contaminados, sendo organismos adequados como bioindicadores de genotoxicidade ambiental, uma vez que representam o nível trófico final da cadeia alimentar aquática e reagem com sensibilidade a agentes estressores ou mudanças ambientais e à baixas concentrações de substâncias genotóxicas presentes no ambiente e que poderiam afetar a diversidade genética de populações aquáticas (ÇAVAS E ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Além disso, esses organismos respondem a agentes tóxicos de forma semelhante aos vertebrados superiores, permitindo uma melhor avaliação das substâncias que são potencialmente teratogênicas,

mutagênicas e cancerígenas para os seres humanos (TORRES DE LEMOS et al., 2007)

A exposição ao petróleo bruto e seus derivados podem induzir uma variedade de sintomas tóxicos em animais experimentais. Hidrocarbonetos de petróleo podem atuar como um mediador na geração de radicais livres nos peixes (ACHUBA e OSAKWE, 2003). Estudos com o peixe dourado *Carassius auratus* tem mostrado um aumento das defesas antioxidantes nesses animais após a exposição a diferentes concentrações da fração solúvel de óleo diesel em água (FSDA), em diferentes tempos experimentais (ZANG et al., 2003, 2004). Outros estudos também indicam que a exposição dos peixes à fração solúvel do petróleo em água, e seus derivados provocam efeitos diferentes nas concentrações de cortisol plasmática (ALKINDI et al., 1996, PACHECO e SANTOS, 2001a, b), sugerindo que estes contaminantes podem interferir na resposta ao estresse dos peixes.

## 1.5 DANOS CAUSADOS PELOS COMPOSTOS QUÍMICOS E DANOS NO DNA

Os compostos químicos presentes nos mais variados efluentes industriais podem causar danos na molécula de DNA dos organismos (LEWIN, 2001). As lesões consistem em qualquer modificação capaz de introduzir um desvio da estrutura normal da molécula dupla e podem ser classificados em duas categorias: 1) modificações de uma única base ou algumas bases e 2) distorções estruturais. A primeira afeta a seqüência do DNA, o que permite que ocorra a replicação e a transcrição quando a fita do duplex do DNA é separada. Já as distorções estruturais podem resultar em impedimentos físicos para a replicação e a transcrição (LEWIN, 2001).

As conseqüências das atividades destes agentes podem variar desde quebra de fita simples e de fita dupla na cadeia de DNA, até ligações cruzadas (*cross-links*) entre as bases de DNA ou entre as bases de DNA e proteínas, e formação de aductos por adição de compostos químicos à base do DNA (PRESTON E HOFFMAN, 2001).

Os danos descritos acima são os precursores das mutações no DNA, que podem ocorrer pontualmente nos genes, assim como nos cromossomos, ambas podendo ocorrer em células somáticas e/ou germinativas. As mutações gênicas envolvem mudança de uma ou poucas subunidades, por substituição, deleção ou adição de pares de base. Enquanto isso, as mutações cromossômicas podem ser classificadas de acordo com o tipo de dano, sendo os estruturais os que envolvem deleção, duplicação, translocação, ou inversão de partes de cromossomos (aneuploidia), e também os indivíduos ou espécies com números cromossômicos (n) múltiplos do comum da espécie ou do gênero (euploidia) (PRESTON E HOFFMAN, 2001).

Deste modo, mutações são alterações genéticas hereditárias não resultantes de processos de recombinação ou segregação. Mesmo considerando a alta fidelidade do mecanismo de replicação de DNA somado ao aparato de reparo celular (revisão), as mutações podem se originar. Quando é resultante de atividades celulares ou interação ao acaso com o ambiente, as mutações são chamadas espontâneas, entretanto, quando o DNA é exposto a compostos chamados mutagênicos, tais como muitos compostos químicos, dentre eles o petróleo e seus constituintes, estes podem elevar os níveis (números) de mutações espontâneas sendo consideradas mutações induzidas (LEWIN, 2001).

Assim sendo, metodologias de estudo de genética toxicológica buscam avaliar os potenciais efeitos da poluição ambiental na forma de agentes genotóxicos sobre a saúde dos ecossistemas (KLEIJANS E VAN SCHOOTEN, 2002) essa avaliação pode ser feita por medidas contínuas de uma variável ambiental ou por monitoramento através de algum organismo biológico (SILVA et al., 2003).

## 1.6 TESTE DO MICRONÚCLEO

Nas técnicas de citogenética clássica, cromossomos são estudados diretamente, sendo feita a observação e a contagem de aberrações nas metáfases. Apesar dessas técnicas fornecerem uma análise bastante detalhada, a complexidade e o trabalho laboratorial em classificar essas aberrações e os problemas de artefatos

ocasionados pela preparação das metáfases têm estimulado o desenvolvimento de sistemas mais simples para avaliar danos cromossômicos (FENECH, 2000).

A análise de micronúcleos foi proposta independentemente por HEDDLE et al. (1983) e SCHMID (1975) como uma alternativa simples para se avaliar danos cromossômicos *in vivo* com populações de células em divisão, tal como as da medula óssea de roedores, e foi adaptado por HOOFTMAN e RAAT (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Ele tem sido aplicado em estudos de antimutagenicidade (RIBEIRO, 2003), na avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001), e em estudos ecotoxicológicos (GRISOLIA E STARLING, 2001), detectando e identificando agentes que alteram o DNA, presentes no ar, água e solo (GRISOLIA E CORDEIRO, 2000).

O ensaio do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico é agora um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica. Entretanto, não é uma técnica que é aplicada para outras populações de células *in vivo* e *in vitro*, devido ao fato de que os micronúcleos podem somente ser expressos em células eucarióticas em divisão, ou seja, o ensaio não pode ser usado eficientemente ou quantitativamente em populações de células que não estejam em divisão ou em populações de células em divisão nas quais a cinética da divisão celular não seja bem conhecida ou controlada (FENECH, 2000).

Embora os mecanismos para a formação de micronúcleos não sejam inteiramente explicados, diversos estudos indicam que as alterações morfológicas nucleares são induzidas em resposta à exposição aos agentes genotóxicos (SERRANO-GARCIA e MONTERO-MONTOYA, 2001).

De acordo com Ribeiro (2003), os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos, não reparados ou reparados erroneamente, induzidos nas células parentais. Sua origem também pode ocorrer durante a divisão celular, devido à quebra cromossômica (clastogenia) ou ao atraso cromossômico na anáfase (aneugenia).

No primeiro caso, os fragmentos cromossômicos, resultantes de quebras, podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Um envoltório nuclear se forma em torno do fragmento, o qual é visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO, 2003). Danos cromossômicos estruturais estão relacionados com exposição direta do agente mutagênico com o DNA e/ou com defeitos intracelulares na replicação do DNA, recombinação ou mecanismo de reparo (FENECH, 2000; SAUNDERS et al., 2000).

No segundo caso, os micronúcleos são formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre falha na segregação cromossômica durante a divisão celular (FENECH, 2000). Compostos químicos que induzem aneuploidia são chamados aneugênicos e caracterizam-se pela interação com mais de um alvo, tais como moléculas envolvidas na união e separação das cromátides (condensação cromossômica, *crossing-over*, cinetócoro, proteínas de ligação cromatídicas), moléculas que são partes essenciais de estruturas contidas no DNA (centrômeros e telômeros), moléculas envolvidas no controle do ciclo celular (ciclina, cdk, p53) e APC (complexos promotores da anáfase), moléculas que fazem parte do aparato mitótico (tubulina, centríolos) e moléculas envolvidas indiretamente no controle do ciclo celular (calmodulina e as moléculas da membrana celular ou nuclear) (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002).

## 1.7 ENSAIO COMETA

Nas duas últimas décadas, novas metodologias para avaliação de danos no DNA têm sido desenvolvidas. Uma das técnicas mais utilizadas para detecção de genotoxicidade tem sido o ensaio do cometa (KAMMANN et al., 2001; KAMER E RINKEVICH, 2002; AKCHA et al., 2003). Esta técnica não é utilizada para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas com o teste do cometa são passíveis de correção (GONTIJO E TICE, 2003), constituindo, portanto, lesões pré-mutagênicas. Por ser considerado sensível, rápido e econômico, o ensaio do cometa tem sido indicado como um método capaz de detectar mudanças na estrutura do DNA (KAMMANN et al., 2001).



Ele foi primeiramente aplicado à ecotoxicologia há aproximadamente 15 anos atrás, e se tornou um dos testes mais populares para detectar a quebra das fitas de DNA em animais aquáticos através de experimentos *in vitro*, *in vivo* e *in situ* (OHE et al., 2004). As vantagens do ensaio cometa para avaliar danos no DNA em animais aquáticos incluem: (a) o dano no DNA é medido em células individuais; (b) a maioria dos tipos de células eucarióticas é satisfatória para o ensaio; (c) só um número pequeno de células é requerida; (d) é geralmente mais rápido administrar e mais sensível que outros métodos disponíveis para a avaliação de quebra de fitas de DNA; (e) a quebra de fitas do DNA se formam rapidamente a partir da exposição ao agente genotóxico, permitindo uma avaliação antecipada da resposta da biota (GONTIJO E TICE, 2003).

De acordo com vários autores (HAYASHI et al.,1998; SPEIT E HARTMANN 1999; TICE et al., 2000; LEE E STEINERT , 2003), o ensaio cometa foi aplicado com sucesso em eritrócitos de muitas espécies de peixes expostos a diferentes agentes genotóxicos, permitindo a avaliação das alterações do DNA induzidas por xenobióticos. Entre as vantagens desta técnica, também pode ser mencionado que o tamanho e o número de cromossomos não são importantes e que a atividade mitótica não é necessária. Este último é especialmente importante em peixes porque a taxa metabólica e índice metabólico variam consideravelmente com a temperatura e, portanto, a atividade mitótica de tecidos é difícil de isolar (HAYASHI et al.,1998).

## 1.8 HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS

As brânquias são o primeiro órgão dos peixes de contato direto com o meio externo, possuindo um fino epitélio que separa a água do sangue circulante, onde várias funções são desempenhadas como as trocas gasosas, osmorregulação e excreção de produtos nitrogenados (FERNANDES E MAZON, 2003). Esse órgão é formado por quatro arcos branquiais de cada lado da faringe que suportam duas colunas de filamentos (holobrânquias) que variam em número e comprimento dependendo da fase de desenvolvimento e da espécie de peixe. Ele é formado pelo epitélio respiratório (lamelas) e não respiratório (filamentos). As lamelas, local onde ocorrem as trocas gasosas, são regularmente espaçadas na parte superior e inferior de cada

filamento. Elas são constituídas por duas camadas de células epiteliais ancoradas na membrana basal que envolve os espaços vasculares formados pelas flanges das células pilares. O sangue flui nesses espaços em direção oposta (contracorrente) à água, o que fornece alta eficiência das trocas gasosas (FERNANDES E MAZON, 2003).

As alterações histopatológicas têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores na avaliação da saúde dos peixes expostos a contaminantes, tanto em laboratório, como em estudos de campo, e constituem ferramentas sensíveis na detecção dos efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo sendo indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (CAMARGO E MARTINEZ, 2007).

### 1.9 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE TESTE: *Hippocampus reidi*

Os cavalos-marinhos (Família Signathidae) (Figura 1) apresentam uma distribuição mundial, principalmente em regiões tropicais de águas quentes originados no oceano Atlântico no período Eoceno (TESKE et al., 2007; FOSTER e VICENT, 2004). Em sua alimentação são carnívoros, alimentando-se de microcrustáceos, larvas de peixes e zooplâncton, que são sugados através do seu focinho tubular (ROSA et al., 2005). São caracterizados por uma distribuição esparsa, baixa mobilidade, pequena abrangência territorial, baixa fecundidade, cuidado parental duradouro, e fidelidade entre parceiros (ROSA et al., 2005; VIEIRA E GASPARINI, 2007). A família Signathidae apresenta indivíduos populares para aquários marinhos por serem atrativos e de aparência fraca. Também são utilizados no consumo por populações asiáticas na culinária, medicina e como suvenires (CASEY et al., 2004).

Jones et al. (2003) descrevem que durante a reprodução, os ovos postos pela fêmea são fertilizados pelo macho, que os guarda numa bolsa na base da sua cauda. Dois meses mais tarde, os ovos rompem-se e o macho realiza violentas contorções para expelir a cria. Quando nascem, são [transparentes](#) e medem pouco mais de um centímetro (ROSA et al., 2005; VIEIRA E GASPARINI, 2007).

Os cavalos-marinhos se localizam de maneira pontual na costa brasileira, indo do Maranhão até Santa Catarina. Vivendo em locais abrigados, como regiões de recifes

e estuarinas, apresentando uma variação de profundidade de 0 a 55m (TESKE et al., 2007). Caracterizam-se por serem maus nadadores, e se ancoram à vegetação ou ao substrato através de uma forte cauda preênsil, e raramente se aventuram por mar aberto para perseguir presas móveis, sendo geralmente considerados predadores de espera (ROSA et al., 2005).

Recentemente o estado do Espírito Santo apresentou uma lista de espécies ameaçadas de extinção, na qual se encontram as duas espécies de cavalo-marinho encontradas no Brasil, *Hippocampus erectus*, muito raro na região e *Hippocampus reidi*, espécie utilizada no atual trabalho (VIEIRA E GASPARINI, 2007).



**Figura 1.** Exemplar de *Hippocampus reidi* utilizado no experimento

Os cavalos-marinhos estão entre os muitos gêneros vulneráveis à exploração ou a outras situações como os danos do habitat, e possuem uma importante função como espécie-bandeira para promover a conservação de ecossistemas (ROSA et al., 2007). Assim como outros singnatídeos, fornecem um foco para os esforços voltados ao uso sustentável dos recursos marinhos (MARTIN-SMITH E VINCENT, 2006). Entendendo que as populações de cavalo-marinho estejam ameaçadas por

uma série de fatores antropogênicos, é necessário um esforço contínuo que, promova melhores condições a estes organismos e a seus habitats.

## 2 REFERÊNCIAS

ACHUBA, F. I.; OSAKWE, S. A. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 29, p. 97–103, 2003.

AKCHA, F.; HUBERT, F. V.; PFHOL-LESZKOWICZ, A. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research**, v. 534, n. 1–2, p. 21–32, 2003.

ALKINDI, A. Y. A.; BROWN, J. A.; WARING, C. P.; COLLINS, J. E. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. **The Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 1291–1305, 1996.

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

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

BARSIENE, J.; LEHTONEN, K. K.; KOEHLER, A.; BROEG, K.; VUORINEN, P. J.; LANG, T.; PEMPKOWIAK, J.; SYVOKIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; REPECKA, R.; VUONTISJARVI, H.; KOPECKA J. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Būtinge area (Baltic Sea). **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 422-436, 2006.

BOLIS, C. L.; PICCOLELLA, M.; DALLA VALLE, A.; RANKIN, J. C. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacological Research**, v. 44, p. 265–280, 2001.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 2000.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 327-336, 2007.

CASEY, S. P.; HALL, H. J.; HELEN, F.; STANLE, H.F.; VINCENT, A. C. J. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, p.261-272, 2004.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264–71, 2005.

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, n. 1–2, p. 93–99, 2003.

CHOY, W. N. Regulatory Genetic Toxicology tests. In: CHOY, W. N. (Ed.). **Genetic toxicology and cancer risk assessment**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 93-113.

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

FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Ed). **Fish Adaptation**. Enfield: Science Publishers, 2003, 418 p.

FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 317, n. 1–3, p. 207–233, 2003.

FOSTER, S. J., VICENT, C. J. Live history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. **The Journal of Fish Biology**, v. 65, p. 1-61, 2004.

FUENTES-RIOS, D.; ORREGO, R.; RUDOLPH, A.; MENDOZA, G.; GAVILAN, J. F.; BARRA, R. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p. 192-199, 2005.

GAUTHIER, L.; TARDY, E.; MOUCHET, F.; MARTY, J. Biomonitoring of the potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. **Science of the Total Environment**, v. 323, p. 47–61, 2004.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 235-239, 2000.

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

GUECHEVA, T.; HENRIQUES, J. A. P.; ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). **Mutation Research**, v. 497, p. 19-27, 2001.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, L.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SIFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v. 399, n. 2, p.125-133. 1998.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; JRHART, B.; MACGREGOR, J. T.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.

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

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological anomalies in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, p. 191-205, 2004.

JONES A. G., MOORE G. I., CHARLOTTA KVARNEMO C., DEETTE WALKER D., AVISEJ. C. Sympatric Speciation as a Consequence of Male Pregnancy in Seahorses. **PNAS**, v. 100, 2003.

KAMER, I.; RINKEVICH, B. In vitro application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 16, n. 2, p. 177-184, 2002.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, v. 498, p. 61-77, 2001.

KIRSCH-VOLDERS M.; VANHAUWAERT A.; BOECK M. D.; DECORDIER I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KLEIJANS, J. C .S.; SCHOOTEN, F. J. Ecogenotoxicology: the evolving field. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.11, p. 173-179, 2002.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003.

LEE, R. F.; ANDERSON, J. W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 705–723, 2005.

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.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 990.

MÁ, X. L.; COWLES, D. L.; CARTER, R. L. Effect of pollution on genetic diversity in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* and the acorn barnacle *Balanus glandula*. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 559–563, 2000.

MARTIN-SMITH, K. M.; VINCENT, A. C. J. Exploitation and trade in Australian seahorses, pipehorses, sea dragons and pipefishes (Family Syngnathidae). **Oryx**, v. 40, p. 141-151, 2006.

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, the genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148–158, 2006.



MONSERRAT, J. M.; GERACITANO, L. A.; BIANCHINI, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. **Comments on Toxicology**, v. 9, p.255-269, 2003.

MONSERRAT, J. M.; MARTINEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M.; PINHO, G. L.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 221-34, 2007.

NIGRO, M.; FALLENI, A.; BARGA, I. D.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 4. p. 339-347, 2006.

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

OVERTON, E. B.; ASHTON, B. M.; MILES, M. S. Historical polycyclic aromatic and petrogen hydrocarbon loading in Northern Central Gulf of Mexico Shelf sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 557-563, 2004.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 64–75, 2001a.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Tissue distribution and temperature dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. **Environment International**, v. 26, p. 149-155, 2001b.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SHENEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. Ecotoxicologia e avaliação de risco do Petróleo. **Série Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador-BA, v. 12, p. 229, 2002.

PRÁ, D.; LAU, A. H.; KNAKIEVICZ, T.; CARNEIRO, F. R.; ERDTMANN, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. **Mutation Research**, v. 585, n. 1–2, p. 79–85, 2005.

PRESTON, J. R.; HOFFMAN, G. R. Genetic toxicology. In: CURTIS D. KLAASSNEN, (Ed). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. USA: McGraw-Hill Companies, 2001. p. 321-350.

PRUSKI, A. M.; DIXON, D. R. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mystilus edulis* L. **Aquatic Toxicology**, v. 57, p. 127–137, 2002.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p.173-200.

ROSA, I. M. L.; ALVES, R. R. N.; BONIFÁCIO, K. M.; MOURÃO, J. S.; OSÓRIO, F. M.; OLIVEIRA, T. P. R.; NOTTINGHAM, M. C. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. **Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, 2005.

ROSS, K.; COOPER, N.; BIDWELL, J. R.; ELDER, J. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 671-679, 2002.

SARKAR, A.; RAY, D; SHRIVASTAVA, A. N.; SARKER, S. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 4, p. 333-340, 2006.

SAUNDERS, W. S.; SHUSTER, M.; HUANG, X.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PETERSEN, I.; GOLLIN, S. M. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **PNAS**, v. 97, p. 303-308, 2000.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

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

SILVA, J. da; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Org). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 167-170.

SPEIT, G; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 113, p. 203–212, 1999.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; RICHARD, T. D. G.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and

effect. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLY, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. JR. (Ed) **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Chelsea: Lewis Publishers, 1992. p. 235-335.

TESKE P. R.; LOCKYEA J. F.; HECHT T.; KAISER H. Does the endangered Knysna seahorse, *Hippocampus capensis*, have a preference for aquatic vegetation type, cover or height? **African Zoology**, v. 42, p. 23-30, 2007.

TICE, R. R.; AGURELLE, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35: 206-221, 2000.

TORRES DE LEMOS, C.; RODEL, P. M.; TERRA N.; D'AVILIA DE OLIVEIRA, N. C.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 391-401, 2007.

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

VIEIRA, F.; GASPARINI, J. L. Os peixes ameaçados de extinção no estado do Espírito Santo. In: PASSAMANI, M.; MENDES, S. L. (Org.) **Espécies da fauna ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo**. Vitória: IPEMA, 2007. p. 87-104.

WAKE, H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 62, p. 131-140, 2005.

WELLS, P. G.; DEPLEDGE, M. H.; BUTLER, J. N.; MANOCK, J. J.; KNAP, A. H. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 10, p. 799-804, 2001.

ZANG, J. F.; SHEN, H.; XU, T. L.; WANG, X. R.; LI, W. M.; GU, Y. F. Effects of long term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, p. 234-239, 2003.

ZANG, J. F.; WANG, X. R.; GUO, H. I.; WU, J. C.; XUE, Y. Q. Effects of water-soluble fraction of diesel oil on the antioxidant defense of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 110-116, 2004.

## II CAPÍTULO

### RESUMO

#### Danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em *Hippocampus reidi* causados pela exposição ao petróleo

Dos setores que contribuem para a poluição aquática, as refinarias de petróleo mostram-se relevantes para a ecotoxicologia. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação de biomarcadores em *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo à concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> por períodos que caracterizem efeitos agudos (12h, 24h, 48h, 96h) e sub-crônicos (168h e 336h), para a investigação de potenciais danos genotóxicos (ensaio cometa), mutagênicos (teste do micronúcleo) e morfológicos (histopatologia de brânquias). Também foi avaliada a recuperação dos organismos por 168h após terem sido expostos por 96h ao contaminante. Cada grupo exposto ao petróleo (n=8) foi acompanhado por um grupo controle (sem contaminante) (n=8). Os resultados indicaram danos genotóxicos em eritrócitos de todos os exemplares de *H. reidi* expostos ao petróleo. Os valores de Índice de Danos (ID) encontrados para todos os tratamentos expostos ao petróleo apresentaram aumento significativo em relação aos seus respectivos grupos controles, e o pico de danos foi observado nos indivíduos expostos ao petróleo por 168h. No experimento de recuperação, houve uma redução significativa dos valores de ID quando comparados com o tratamento de 96h de exposição ao contaminante. Os danos mutagênicos foram observados a partir da frequência da incidência de micronúcleos em eritrócitos de *H. reidi* que, no qual o grupo exposto por 96h foi o que apresentou os maiores valores entre todos os períodos de exposição ao contaminante. O experimento de recuperação revelou uma expressiva redução nas frequências de micronúcleos observadas nos eritrócitos de *H. reidi* quando comparados com os valores encontrados no grupo exposto à 96h da primeira etapa do trabalho. O exame microscópico das brânquias dos exemplares de *H. reidi* utilizados no experimento revelou a presença de diversas alterações histopatológicas, todas com estágio de severidade I. As alterações mais frequentes foram hipertrofia e proliferação (hiperplasia) das células pavimentosas do epitélio lamelar, congestão vascular, descolamento epitelial e fusão das lamelas. O experimento de recuperação demonstrou que o período de 168h (7 dias), livre do contaminante, é insuficiente para a recuperação das histopatologias encontradas nas brânquias de *H. reidi* após exposição ao petróleo. Esses resultados evidenciam que a exposição aguda e sub-crônica ao petróleo é capaz de provocar danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em *H. reidi* e que este provou ser um bom biomarcador de toxicidade. No presente estudo o ensaio cometa demonstrou ser o biomarcador mais sensível ao contaminante em relação ao teste do micronúcleo, uma vez que conseguiu identificar um elevado índice de danos no material genético de *H. reidi* com apenas 12h de exposição e mesmo após 168h de exposição.

**Palavras-chave:** *Hippocampus reidi*; Petróleo; Danos genotóxicos, Danos mutagênicos, Danos morfológicos, Recuperação.

## ABSTRACT

### **Genotoxic, mutagenic and morphological damage in *Hippocampus reidi* (Ginsburg, 1933) caused by exposure to crude oil**

Considering the industries that most contribute to water pollution, oil refineries play an important role in the ecotoxicology of aquatic environments. In this scenario, the present article evaluates the biomarkers in *Hippocampus reidi* exposed to crude oil as a 10-mL.L<sup>-1</sup> solution for periods that characterize acute effects (12, 24, 48 and 96-h) and subchronic effects (168 and 336-h) to investigate potential genotoxic (comet assay), mutagenic (micronucleus test) and morphological damage (gill histopathology). The recovery of organisms was also assessed for 168 h after being exposed to the contaminant for 96 h. A control group (n=8) was used with each group exposed to crude oil (n=8). The results revealed the occurrence of genotoxic damage in erythrocytes of all *H. reidi* specimens exposed to crude oil. The damage index (DI) observed for all exposure series was significantly higher in comparison to the respective control groups, and the highest DI was observed in specimens exposed to crude oil for 168 h. In the recovery experiment, a significant decrease in DI values was observed when compared to the 96-h exposure to the contaminant. Mutagenic damage was observed based on the frequency of the incidence of micronuclei in erythrocytes of *H. reidi*. The group exposed to crude oil for 96-h presented the highest values in comparison to all other exposure times. The recovery experiment revealed a significant reduction in micronuclei frequencies observed in *H. reidi* erythrocytes when compared to the group exposed to crude oil for 96-h in the first stage of the experiment. The microscopic inspection of gills of *H. reidi* used in the experiment revealed the presence of several histopathological changes, all of which were severity stage I lesions. The most frequent changes were hypertrophy and proliferation (hyperplasia) of pavement cells of the lamellar epithelium, vascular congestion, epithelium detachment and lamellar fusion. The recovery experiment revealed that the 168-h period (7 days) with no exposure to the contaminant is not enough to recover the histopathologies observed in *H. reidi* gills after exposure to crude oil. The results show that the acute and subchronic exposure to crude oil may cause genotoxic, mutagenic and morphological damage in *H. reidi* and that the *Hippocampus reidi* is a good toxicity marker. In the present study, the comet assay was shown to be the most sensitive biomarker to the contaminant used, as compared to the micronucleus test, since it identified a high DI in the genetic material of *H. reidi* with only 12-h exposure and even after 168-h exposure.

**Keywords:** *Hippocampus reidi*; Crude oil; Genotoxic damage; Mutagenic damage; Morphological damage; Recovery.

# 1 INTRODUÇÃO

O petróleo e seus produtos refinados são encontrados em todo o planeta (ALBERS, 2002), o que justifica a preocupação global com a contaminação provocada por derrames de petróleo que, em sua maioria são causados pelo transporte marítimo de produtos (HAMOUTENE et al., 2002). A compreensão do comportamento dos diferentes componentes do petróleo no solo, água e ar é muito importante para a avaliação dos efeitos à saúde e à biota decorrente dessa exposição, constituindo hoje um grande desafio para os ecotoxicologistas (PEDROZO et al., 2002).

Muitos relatos na literatura enfocam os efeitos tóxicos do petróleo sobre diversos organismos aquáticos, incluindo peixes, (WENG et al., 2000; ZHOU et al., 2004; PEREZ et al., 2008). Estes estudos mostram que os peixes podem absorver contaminantes da água via superfície branquial e através de sedimento ou alimentos contaminados e, finalmente, terminam por impactar a cadeia alimentar (VARANASI et al., 1989). Além disso, a contaminação pelo petróleo pode causar a diminuição da desova de muitos organismos aquáticos, e aumento das anomalias e da mortalidade de larvas de peixes (GONZALEZ-DONCEL et al., 2008). Entre os componentes de uma contaminação por petróleo, aqueles que causam maior preocupação envolvendo danos severos ao ambiente são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), que apresentam elevada toxicidade em ambientes aquáticos (INCARDONA et al., 2004; LEE E ANDERSON, 2005).

Os efeitos genotóxicos de toxinas ambientais podem ser monitorados por meio de uma ampla gama de biomarcadores, tanto *in vitro* e *in vivo*. Recentemente, o teste do micronúcleo e o ensaio cometa vêm ganhando popularidade sobre os outros ensaios na investigação de toxicidade aquática, devido à sua sensibilidade para detectar danos no DNA e o curto espaço de tempo necessário para completar seu estudo (AL-SABTI E METCALFE, 1995; TICE et al., 2000; ÇAVAS E KONEN, 2008). Essas análises são utilizadas em estudos de avaliação ambiental com o propósito de descobrir os efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas puras ou misturas de substâncias químicas, ambos sob condições de campo ou de laboratório (LEMOS et al., 2005). O potencial de aplicação do ensaio cometa e do teste do micronúcleo para biomonitoramento ambiental é quase ilimitado, podendo ser aplicado a diversos organismos aquáticos (HAUMOUTENE et al., 2002; KLOBUCAR et al., 2003).

As alterações histológicas em tecidos de peixes também constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-

alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais, uma vez que análises morfológicas constituem um dano em um nível biológico maior do que alterações genotóxicas e/ou mutagênicas (SCHWAIGER et al., 1997). Estes biomarcadores são excelentes para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas de monitoramento ambiental de países desenvolvidos (WALKER et al., 1996).

Os cavalos-marinhos (*Hippocampus spp.*) geralmente vivem em habitats costeiros, em águas temperadas e tropicais (TESKE et al., 2007). Apresentam uma densidade populacional baixa e distribuição esparsa, caracterizam-se por serem maus nadadores e por ancorarem à vegetação ou ao substrato através de uma forte cauda preênsil, e raramente se aventuram por mar aberto para perseguir presas móveis, ou colonizarem novos ambientes (ROSA et al., 2005; VIEIRA E GASPARINI, 2007). A família Signathidae apresenta indivíduos populares para aquariofilia e também é utilizada no consumo por populações asiáticas para práticas de culinária, medicina tradicional e como suvenires (CASEY et al., 2004). No estado do Espírito Santo, a espécie *Hippocampus reidi* figura na lista de espécies ameaçadas de extinção.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivos a avaliação de biomarcadores em exemplares de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo por períodos que caracterizem efeitos agudos e sub-crônicos, para a investigação de potenciais danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos, além de uma avaliação da recuperação desses possíveis danos após exposição ao petróleo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Foram utilizados 112 exemplares adultos de *Hippocampus reidi* (cavalo-marinho), com aproximadamente 5 meses de vida ( $9,35 \pm 0,68\text{cm}$  e peso médio de  $2,08 \pm 0,42\text{g}$ ), com proporção igual entre os sexos, (50% machos e 50% fêmeas). Os animais foram adquiridos do criadouro de cavalos marinhos Juan Pablo de Marco e Irmão Ltda., Serra - ES, e transferidos para o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, no complexo Biopráticas do Centro Universitário Vila Velha - UVV. No laboratório, os indivíduos foram aclimatados em aquários de vidro, com capacidade de 40L (Figura 1), por um período mínimo de 15 dias, com troca periódica de água, duas vezes por semana.

A água salgada para o abastecimento dos aquários de manutenção e dos aquários testes foi proveniente de um ponto localizado na orla de Vila Velha, ES, ( $20^{\circ}21'13''\text{S}$ ,  $40^{\circ}17'02''\text{O}$ ) com índices de balneabilidade classificado como excelente pelo Instituto Estadual do Meio Ambiente do ES, o IEMA de acordo com a resolução CONAMA Nº 274/00. Ao ser levada para o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, a água foi filtrada utilizando filtros de papel e, quando necessário, a salinidade foi corrigida utilizando água deionizada preparada no dia ou com o acréscimo de sal marinho sintético (marca Coralife), com a finalidade de manter as mesmas condições de salinidade encontradas no criadouro ( $28 \pm 1$ ).

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com misidáceos coletados na natureza e congelados, fornecidos pelo próprio criadouro. A alimentação foi suspensa 24h antes dos animais serem transferidos para os aquários testes.





**Figura 1.** Aquário de aclimatação (40L) dos exemplares de *Hippocampus reidi*.

## 2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 2.2.1 Exposição ao petróleo em diferentes períodos – 1ª Etapa

Após o período de aclimatação, os exemplares de *H. reidi* tiveram seu status de saúde averiguado, sendo avaliada a mobilidade dos indivíduos nos aquários e as boas condições físicas de cada um, e só então as séries de experimentos foram iniciadas. Sendo assim, os animais foram transferidos individualmente para os aquários testes: aquários de polietileno, com capacidade de 3L e aeração constante (Figura 2). A água dos aquários testes possuía as mesmas características físico-químicas da água dos aquários de aclimatação, especificados a seguir.

Vinte e quatro horas após os animais terem sido transferidos para os aquários testes, foi adicionada à água a quantidade de 10mL de petróleo (óleo cru) por litro de água marinha (Figura 3). Os animais foram mantidos nesta condição por diferentes

períodos de exposição: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h (7 dias) e 336h (14 dias). O experimento ocorreu em condição estática e durante o período de exposição os indivíduos não foram alimentados.



**Figura 2.** Aquários testes com capacidade de 3L nos quais os exemplares de *Hippocampus reidi* foram expostos ao petróleo ( $10\text{mL.L}^{-1}$ ) acompanhados do grupo controle ( $n=8$ ).



**Figura 3.** Momento da contaminação dos aquários testes com petróleo ( $10\text{mL.L}^{-1}$ ).

Em cada tempo de exposição oito exemplares de *H. reidi* foram expostos individualmente em cada aquário teste, sendo que cada um desses períodos foi

acompanhado por um grupo controle (água sem contaminante), com n=8, também expostos individualmente em aquários testes similares ao dos grupos expostos.

A concentração de petróleo utilizada no presente trabalho é resultado de uma pesquisa realizada anteriormente no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, em que grupos de cavalos-marinhos foram expostos por 96h a três concentrações distintas de petróleo (10, 20 e 30mL de petróleo por litro de água), sendo que na menor concentração de petróleo testada já foram observadas alterações significativas em análises genotóxicas e mutagênicas.

### **2.2.2 Recuperação – 2ª Etapa**

Oito exemplares de *H. reidi* foram expostos individualmente à concentração de petróleo de 10mL.L<sup>-1</sup> por um período de 96h, nos mesmos aquários testes usados no experimento anterior e também com as mesmas características físico-químicas da água. Após este período de exposição, os indivíduos foram transferidos individualmente para aquários com capacidade de 3L, e aeração constante, onde permaneceram por 168h (7 dias), a fim de se verificar uma possível recuperação significativa dos parâmetros avaliados nos indivíduos que compuseram a primeira etapa do trabalho. A água desses aquários de recuperação também foi mantida com as mesmas características físico-químicas da água de aclimação e dos experimentos e sem indicação de contaminação. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle (n=8, expostos individualmente).

## **2.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA DE ACLIMATAÇÃO E DOS EXPERIMENTOS**

As características físico-químicas da água nos aquários de aclimação foram medidas com o auxílio do Multiparâmetro YSI 85: temperatura 22°C ± 1°C, oxigênio 7mgO<sub>2</sub>/L ± 0,5mgO<sub>2</sub>/L, e salinidade 28 ± 1. O pH foi medido com um potenciômetro digital Quimis 400, os valores medidos foram: 8,14 ± 0,14.

## 2.4 ORIGEM E COMPOSIÇÃO DO PETRÓLEO

O petróleo utilizado nos experimentos foi referente a uma amostra doada pela Petrobras do Espírito Santo. A composição do petróleo bruto foi analisada por cromatografia gasosa (modelo Clarus 500, Permin-Elkan) e apresentou as seguintes características: 15,2% v/v de PAHs totais; 0,48% v/v de benzeno; 1,9% v/v de tolueno; 3,5% v/v de xileno; 28,6 mg/L de naftaleno; 0,97 mg/L de fenantreno e 1,9 mg /L de fluoreno.

## 2.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados com uma solução de benzocaína  $0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . O sangue foi coletado por punção caudal, utilizando seringas previamente heparinizadas (Figura 4), para ser utilizado nas técnicas do teste do Micronúcleo e do Ensaio Cometa. Imediatamente após a retirada do sangue, os peixes foram sacrificados por secção cervical, de acordo com Winkaler et al. (2007), para a remoção dos dois arcos branquiais centrais (DIAZ et al., 2005) e fixados em formaldeído 4% até o momento das análises.

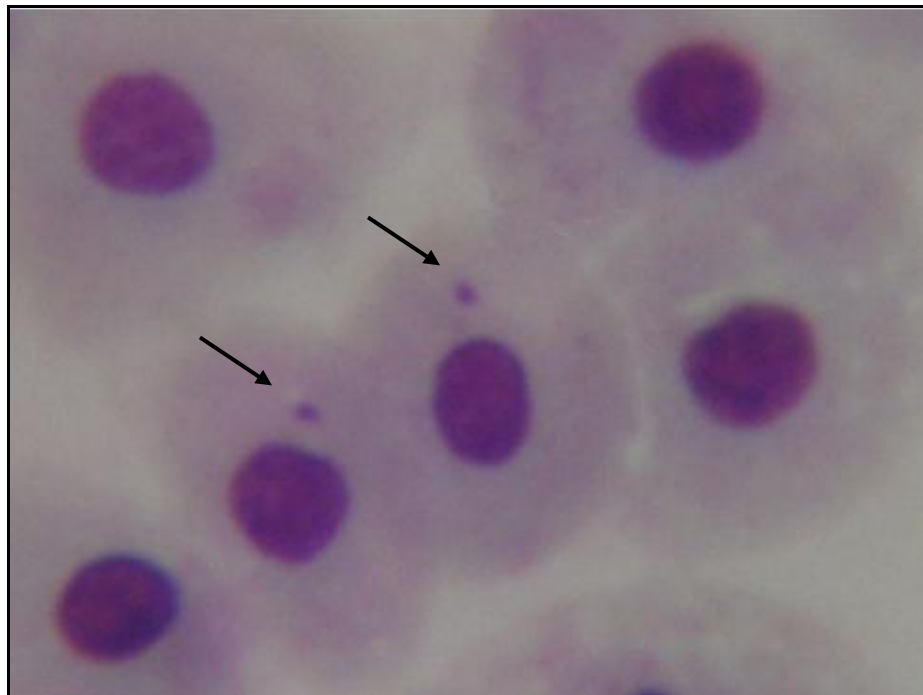


**Figura 4.** Momento da punção caudal do sangue de um exemplar de *Hippocampus reidi*.

## 2.6 ENSAIO DO MICRONÚCLEO

O sangue de cada animal foi coletado e gotejado sobre duas lâminas para a realização de extensões sangüíneas. Após secas em temperatura ambiente por um período de 24h, as lâminas foram submetidas a um banho de 30 minutos em Metanol P. A. (100%) para fixação das células eritrocitárias. Sendo coradas em seguida com uma solução de Giemsa 5% por 40 minutos; lavadas posteriormente com água destilada e secas em temperatura ambiente por 24h, como descrito por Grisolia et al. (2005). Depois de seco, o material foi observado em microscópio de luz em resolução de 400x. Mil células sanguíneas (eritrócitos) foram contadas em cada lâmina para a quantificação dos micronúcleos presentes (Figura 5). Os valores de micronúcleos obtidos no presente trabalho correspondem a uma média realizada a partir da contagem de duas lâminas por peixe exposto em cada período de exposição.

Os micronúcleos (MNs) foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech et al. (2003).



**Figura 5.** Eritrócitos de um exemplar de *Hippocampus reidi* com a presença de micronúcleos.

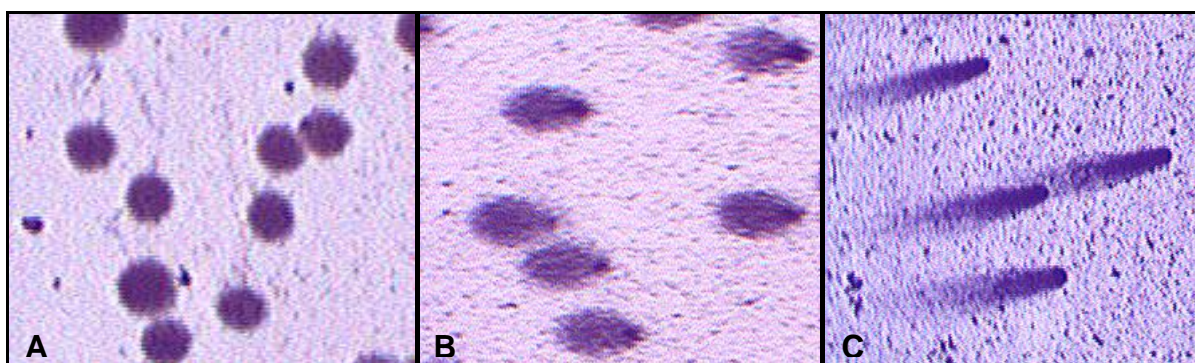


## 2.7 ENSAIO COMETA

A análise de fragmentos de DNA foi realizada utilizando ensaio alcalino do cometa alcalino e coloração com nitrato de prata modificado de Tice et al. (2000) e Andrade et al. (2004). O método consiste na detecção de fragmentos de DNA em um microgel de agarose. Para isso lâminas de microscopia, duas para cada exemplar de *H. reidi*, foram previamente cobertas com agarose 1,5% (1,80g de agarose e 120mL de tampão fosfato alcalino, pH 7,4). As amostras de sangue foram diluídas 20 vezes em tampão fosfato e posteriormente, 10 $\mu$ L do sangue diluído foi misturado com 100 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão ou “*low melting*” (0,15g de agarose em 20mL de tampão fosfato alcalino, pH 7,4) a 40°C. Em seguida foram colocadas sobre as lâminas com pré-cobertura e recobertas com lamínulas para o gel se aderir uniformemente até solidificar. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram colocadas em uma solução de lise (146,1g NaCl (2,5M), 37,2g EDTA (100mM), 1,2g de Tris (10mM), 1 litro de água destilada e o pH da solução foi ajustado para 13 com NaOH e no momento do uso foram adicionados 1% de Triton X-100 e 10% DMSO) por no mínimo 2h, em geladeira e protegidos da luz. Após o período da lise celular, as lâminas foram colocadas em uma cuba eletroforética e mergulhadas em tampão eletroforético (300mM NaOH e 1mM EDTA em pH>13) por um período de 20 min. Em seguida foi realizada a corrida eletroforética em 25V e 300mA por 15 min. Após esta etapa as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (48,5g de Tris em 1 litro de água destilada) durante 5 min. por três vezes e lavadas com água destilada por duas vezes. As lâminas foram secas por 2h a 37°C. Após esse período as lâminas foram fixadas em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco (heptahidratado), 5% de glicerol e 1 litro de água destilada) por 10 min. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas por três vezes com água destilada e secas por 2h a 37°C. Depois de secas as lâminas foram hidratadas por 5 min com água destilada e coradas com solução de coloração com prata (66mL da solução de carbonato de cálcio (12,5g de carbonato de cálcio para 250mL de água) e 34mL da solução de nitrato de prata (50mg de nitrato de prata, 50mg de nitrato de amônio, 250mg de ácido tungstosalicílico e 125 $\mu$ l de formaldeído) por 15 min a 37°C. Depois de coradas as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e então submersas por 5 min em solução *stop* (ácido acético 1%). Passado os 5 min de

reação, foram novamente lavadas por três vezes e secas em temperatura ambiente por um período de 24h.

Foram contabilizadas 100 células por animal, selecionadas aleatoriamente e não-sobrepostas. Cinquenta células foram analisadas por lâmina, com duas lâminas por animal, as quais foram classificadas de acordo com o dano que apresentavam, ou seja, o tamanho da cauda formado por arraste de DNA fragmentado, em 4 classes: 0, ausência de dano; 1, dano mínimo, 2, dano médio e 3, dano máximo, de acordo com Kobayashi et al. (1995) (Figura 6). O índice de danos (ID) analisado pelo ensaio cometa foi calculado com a somatória do número de nucleoides observados em cada classe de dano multiplicado pelo valor de sua respectiva classe de danos (0, 1, 2 ou 3). Esses valores demonstram os danos apresentados nos tratamentos de acordo com Heuser et al. (2008). Os resultados foram expressos como a média de dano, para cada período de exposição. Em todo o experimento, as células foram analisadas em teste cego e sempre pelo mesmo observador.



**Figura 6.** Ensaio Cometa: (A) classe de dano nível 0; (B) classe de dano de nível 1; (C) classe de dano nível 2.

## 2.8 HISTOLOGIA BRANQUIAL

### 2.8.1 Histopatologia

Para a observação de possíveis histopatologias branquiais foram utilizados cinco indivíduos de cada período de exposição ao petróleo (incluindo dos grupos controles), dos quais retirou-se amostras das brânquias que foram posteriormente lavadas em solução salina 0,9% e fixadas em formaldeído 4%. As brânquias foram desidratadas em bateria crescente de álcoois e incluídas em metacrilato (Historesina

Leica). Cortes sagitais não seriados de 3µm de espessura foram realizados para a confecção das lâminas, os quais foram corados com Azul de Toluidina e posteriormente analisados em microscópio de luz (Leica). A ocorrência de alterações histopatológicas nos órgãos foi avaliada semi-quantitativamente de duas formas: a) Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Para tanto, atribui-se um valor numérico para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alterações histopatológicas), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão); b) Cálculo do Índice de Alterações Histopatológicas (IAH), com base na severidade de cada lesão de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). Para tanto, as alterações foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais (Tabela 1): alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do tecido; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis. Um valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula:  $IAH = 10^0 \Sigma I + 10^1 \Sigma II + 10^2 \Sigma III$ , sendo *I*, *II* e *III* corresponde ao número de alterações de estágio *I*, *II* e *III*, respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam um funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 indicam danos de leves a moderados no órgão; valores entre 21 e 50 indicam danos de moderados a severos e valores maiores que 100 indicam danos irreparáveis no tecido.



**Tabela 1.** Listagem dos tipos de histopatologias mais freqüentes em brânquias de peixes.

| <b>ESTÁGIOS</b>                 |                                   |               |
|---------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| I                               | II                                | III           |
| Hipertrofia do epitélio lamelar | Aneurisma Lamelar                 | Necrose focal |
| Hiperplasia do epitélio lamelar | Ruptura epitelial<br>(hemorragia) | Necrose total |
| Congestão vascular              |                                   |               |
| Dilatação capilar               |                                   |               |
| Descolamento epitelial          |                                   |               |
| Constrição capilar              |                                   |               |
| Proliferação de células cloreto |                                   |               |
| Proliferação de células mucosa  |                                   |               |
| Fusão das lamelas               |                                   |               |
| Edema                           |                                   |               |

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no teste do Micronúcleo foram expressos como mediana e erro padrão da mediana. Os resultados encontrados a partir do ensaio cometa foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). Os resultados obtidos nos diferentes períodos de exposição foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e teste *a posteriori* de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o pacote estatístico Sigma Stat 2.0. O teste t (*student*) foi aplicado para a observação de possíveis diferenças estatísticas entre os grupos expostos e seus respectivos grupos controles.

Para a avaliação da distribuição normal das médias encontradas na observação dos danos morfológicos a partir da histopatologia de brânquias, foi aplicado um teste *post-hoc* de Kolmororov-smirnov. Após a avaliação da distribuição normal das médias foram aplicados dois testes paramétricos para a observação de possíveis diferenças estatísticas entre os tratamentos (tukey-krumer) e entre os tratamentos e seus respectivos grupos controles (Teste T).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 ANÁLISE DA ÁGUA E MORTALIDADE

A composição da fração solúvel do óleo bruto foi analisada por cromatografia gasosa (modelo Clarus 500, Permim-Elkan) e apresentou as seguintes características: 10,1% v/v de PAHs totais; 0,12% v/v de benzeno; 0,9% v/v de tolueno; 2,1% v/v de xileno; 12,0 mg/L de naftaleno; 0,41 mg/L de fenantreno e 0,87mg/L de fluoreno.

No presente experimento, no grupo exposto ao contaminante por 336h, houve mortalidade de um indivíduo em 312h (13dias), que não foi repostado, sendo que este grupo apresentou n=7.

### 3.2 EFEITOS MUTAGÊNICOS

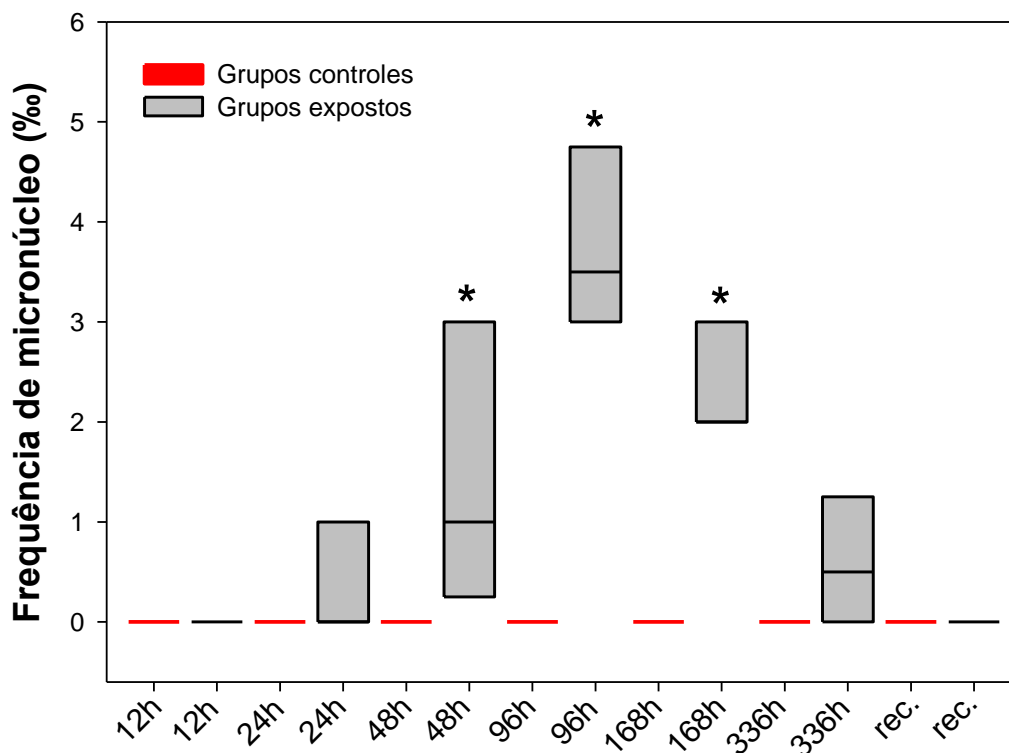
#### 3.2.1 Teste do Micronúcleo

Com o intuito de avaliar o potencial mutagênico do petróleo, o Teste do Micronúcleo foi realizado em eritrócitos de *H. reidi* expostos ao óleo cru em uma concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> em seis períodos de exposição distintos. A ocorrência de eritrócitos micronucleados observadas neste trabalho está demonstrada na Figura 7.

Observa-se, a partir da figura 7, que no primeiro período de exposição (12h) não foi encontrado nenhum micronúcleo nos eritrócitos dos indivíduos testados, se igualando aos grupos controles dos demais períodos de exposição. Foi encontrada quantidade significativa de micronúcleos nos animais expostos aos períodos de 48h, 96h e 168h, sendo a frequência da incidência de micronúcleos encontrada no grupo exposto por 96h foi a maior entre todos os períodos de exposição ao contaminante, e depois deste período, os valores da frequência de micronúcleos encontrados em eritrócitos de *H. reidi* expostos ao óleo por 168h tendem a cair e, apesar de serem estatisticamente superiores ao seu grupo controle, os resultados encontrados são semelhantes aos encontrados no grupo exposto por 48h ao petróleo. Após 336h de

exposição, a frequência de micronúcleos encontrada não é diferente daquelas encontradas nos organismos que ficaram sob 12h e 24h de exposição.

### Teste do Micronúcleo



**Figura 7.** Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos à concentração de petróleo de  $10\text{mL.L}^{-1}$  em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h, e seus respectivos grupos controles. Além do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem o contaminante por 7 dias, e seu respectivo grupo controle. \* Indica diferença significativa em relação ao grupo controle com  $p < 0,05$ . Os dados estão apresentados em Mediana  $\pm$  Erro Padrão da Mediana.

O experimento de recuperação revelou uma redução nas frequências de micronúcleos observadas nos eritrócitos de *H. reidi* quando comparados com os valores encontrados no grupo exposto às 96h da primeira etapa do trabalho. Os

valores de MNs encontrados no grupo recuperado após exposição ao petróleo foram similares aos encontrados no seu respectivo grupo controle.

### 3.3 EFEITOS GENOTÓXICOS

#### 3.3.1 Ensaio Cometa

Os efeitos genotóxicos do petróleo em eritrócitos de *Hippocampus reidi*, medidos através do ensaio cometa em indivíduos expostos à concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h e respectivos grupos controles, além do experimento de recuperação, estão apresentados na Tabela 2.

Os valores de Índice de Danos (ID) encontrados para todos os tratamentos expostos ao petróleo apresentaram aumento significativo em relação aos seus respectivos grupos controles (Figura 8).

Observa-se que os tratamentos de 12h e 24h apresentam os menores valores de ID, não diferindo estatisticamente entre si. Também é possível observar que à medida que aumenta o período de exposição ao petróleo, há um aumento gradativo dos valores de ID, e que o pico de danos foi observado nos indivíduos expostos ao petróleo por 168h. Após este período de exposição os valores tendem a cair, e o ID do tratamento de 336h é estatisticamente equivalente ao encontrado no tratamento de 96h de exposição ao contaminante.

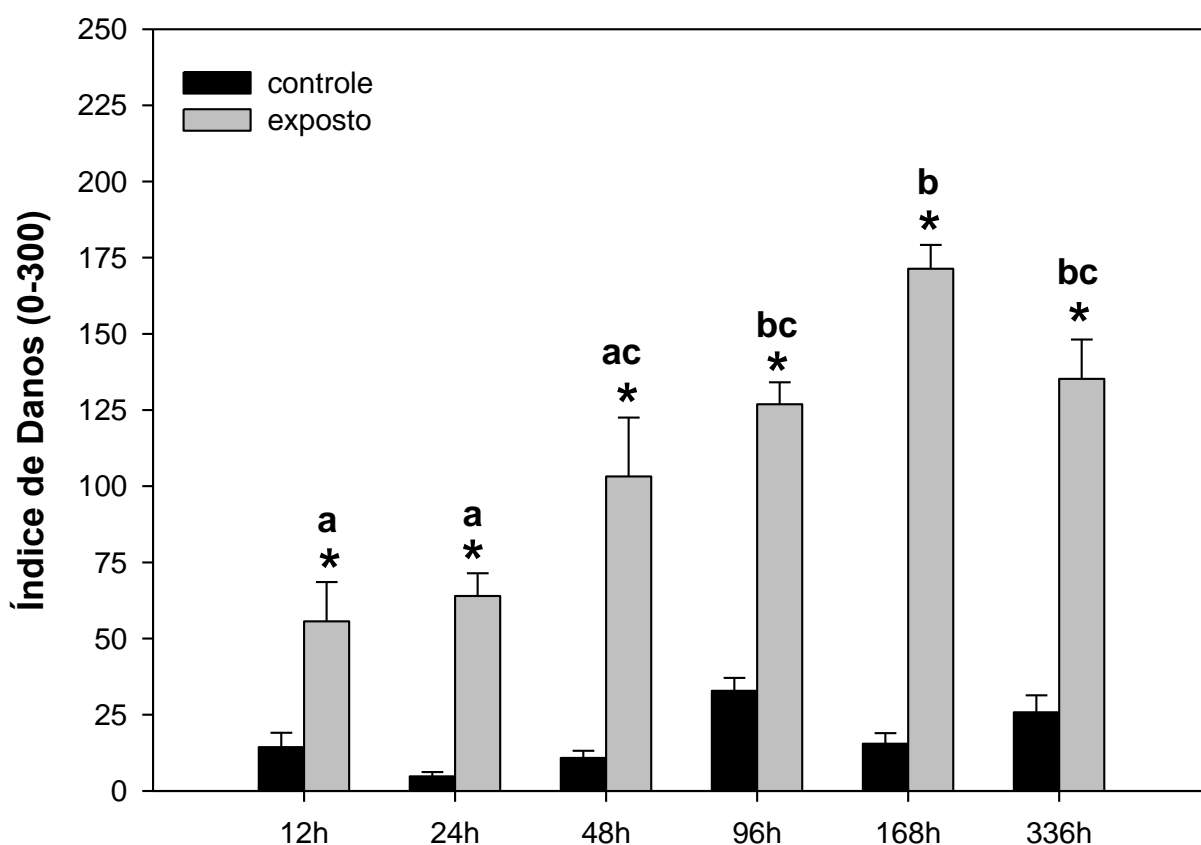
No experimento de recuperação, houve uma redução significativa dos valores de ID quando comparados com o tratamento de 96h de exposição ao contaminante, e esses resultados foram similares aos encontrados para o seu grupo controle (Figura 9).

Analisando a distribuição dos cometas em cada classe (Tabela 2), é possível observar que nos tratamentos de 12h e 24h de exposição ao contaminante houve um predomínio da classe 0 sobre as demais classes, e nas classes I e II os valores encontrados foram significativamente maiores que em seus respectivos controles. O tratamento de 48h também revelou que os valores das classes I e II foram estatisticamente superiores que seus respectivos grupos controles. No tratamento de 96h a classe de cometa mais encontrada foi a de classe II. No presente experimento, a classe 0 teve seu menor valor encontrado nos indivíduos expostos ao óleo cru por 168h, neste grupo a classe II foi a mais representativa, e os valores da classe II foram os mais altos quando

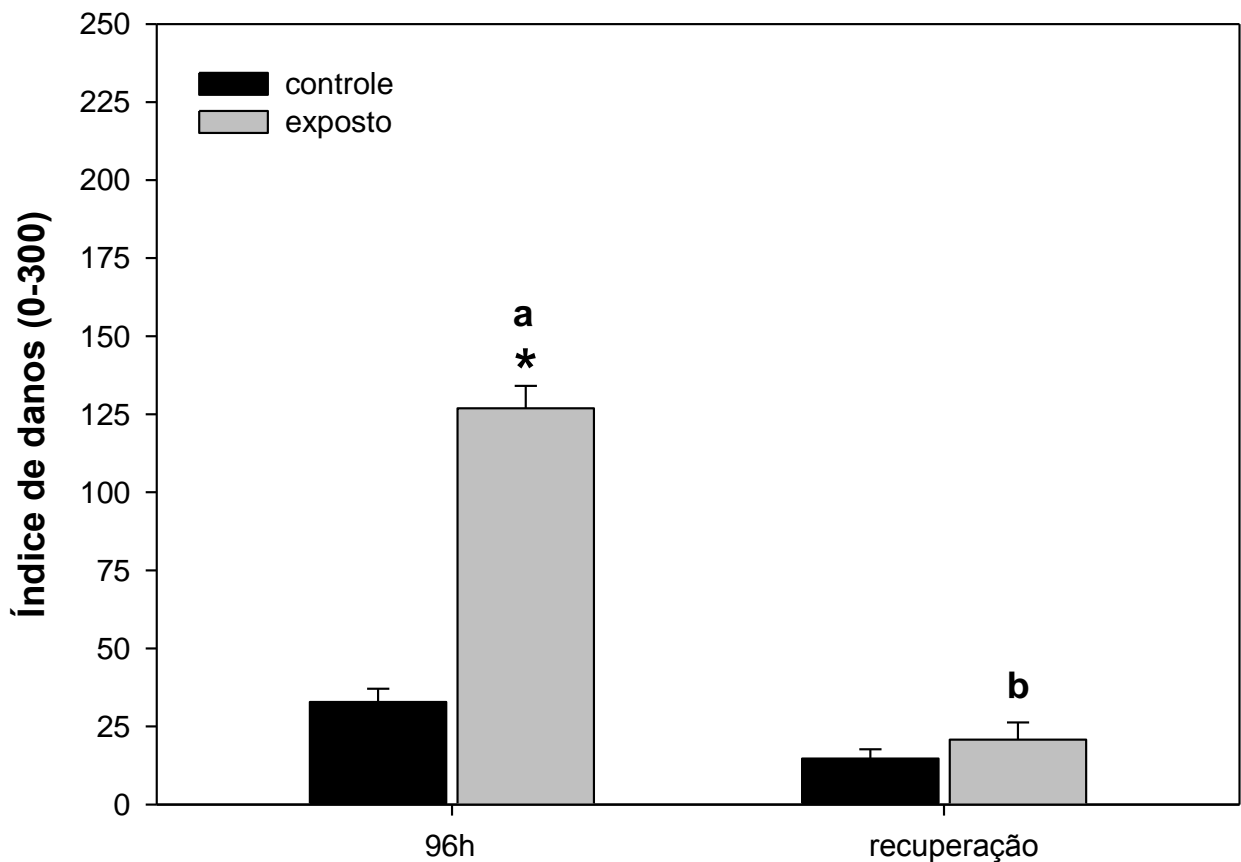
comparados aos grupos expostos aos demais tempos. O grupo em que os indivíduos foram expostos ao petróleo por 336h também apresentou a classe II como a mais frequentemente encontrada nos eritrócitos do sangue periférico.

Não foram encontradas neste estudo células apresentando dano máximo no material genético (apoptose), classificadas como pertencentes à classe III, em nenhum dos períodos de tratamento.

Os exemplares de *H. reidi* utilizados no experimento de recuperação tiveram uma excelente recuperação averiguada, visto que ocorreu uma diminuição significativa na incidência de danos no DNA nas classes I e II quando comparados aos peixes expostos ao petróleo por 96h, sendo estes valores similares aos encontrados para o seu respectivo grupo controle.



**Figura 8.** Frequência do Índice de Danos no DNA em eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h e seus respectivos grupos controles. Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. \* indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,05. Os dados estão apresentados em Média ± Erro Padrão da Média.



**Figura 9.** Frequência do Índice de Danos no DNA em eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo na concentração de  $10\text{mL.L}^{-1}$  por 96h e do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem o contaminante por 7 dias, e seus respectivos grupos controles. Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. \* indica diferença em relação ao grupo controle com  $p < 0,05$ . Os dados estão apresentados em Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

**Tabela 2.** Efeitos genotóxicos do petróleo, através do ensaio cometa, observados por meio das classes de danos no DNA em eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h e seus respectivos grupos controles. Além do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem contaminante por 7 dias e seu respectivo grupo controle.

| Tempo       | Tratamentos                   | Classe 0                      | Classe 1                      | Classe 2                       | Classe 3 |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------|
| 12h         | Controle                      | 87,250 ± 3,912                | 11,125 ± 3,241                | 1.625 ± 1.068                  | 0.000    |
|             | Petróleo 10mL.L <sup>-1</sup> | 56,938 ± 7,296 <sup>*a</sup>  | 30,500 ± 2,355 <sup>*ac</sup> | 12,563 ± 5,789 <sup>*a</sup>   | 0.000    |
| 24h         | Controle                      | 95,250 ± 1,439                | 4,750 ± 1,439                 | 0.000                          | 0.000    |
|             | Petróleo 10mL.L <sup>-1</sup> | 50,250 ± 5,192 <sup>*ac</sup> | 35,563 ± 5,240 <sup>*a</sup>  | 14,188 ± 3,842 <sup>*ad</sup>  | 0.000    |
| 48h         | Controle                      | 90,625 ± 1,805                | 7,938 ± 1,465                 | 1.438 ± 0.804                  | 0.000    |
|             | Petróleo 10mL.L <sup>-1</sup> | 33,250 ± 8,788 <sup>*bc</sup> | 30,313 ± 4,364 <sup>*ad</sup> | 36,438 ± 10,926 <sup>*cd</sup> | 0.000    |
| 96h         | Controle                      | 67,125 ± 4,170                | 32,875 ± 4,170                | 0.000                          | 0.000    |
|             | Petróleo 10mL.L <sup>-1</sup> | 20,625 ± 2,114 <sup>*bd</sup> | 31,875 ± 3,668 <sup>ac</sup>  | 47,500 ± 5,313 <sup>*c</sup>   | 0.000    |
| 168h        | Controle                      | 85,688 ± 2,950                | 13,125 ± 2,465                | 1,188 ± 0,597                  | 0.000    |
|             | Petróleo 10mL.L <sup>-1</sup> | 8,750 ± 2,691 <sup>*de</sup>  | 11,125 ± 2,682 <sup>bcd</sup> | 80,125 ± 5,211 <sup>*b</sup>   | 0.000    |
| 336h        | Controle                      | 80,125 ± 3,845                | 13,938 ± 2,306                | 5,938 ± 1,774                  | 0.000    |
|             | Petróleo 10mL.L <sup>-1</sup> | 14,417 ± 4,384 <sup>*be</sup> | 35,917 ± 4,816 <sup>a</sup>   | 49,667 ± 8,683 <sup>*c</sup>   | 0.000    |
| Recuperação | Controle                      | 86,500 ± 2,622                | 12,313 ± 2,489                | 1,188 ± 0,779                  | 0.001    |
|             | Petróleo 10mL.L <sup>-1</sup> | 80,563 ± 4,788 <sup>**</sup>  | 18,125 ± 4,086 <sup>**</sup>  | 1,313 ± 0,812 <sup>**</sup>    | 0.002    |

Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. \* indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,05; \*\* indica diferença entre o grupo exposto de 96h e o grupo do experimento de recuperação com p<0,05. Os dados estão apresentados em Média ± Erro Padrão da Média.

## 3.4 EFEITOS MORFOLÓGICOS

### 3.4.1 Histopatologia de Brânquias

A estrutura branquial de *H. reidi* é semelhante à de outros peixes. A região respiratória é constituída por filamentos e lamelas contínuas ao arco branquial e dispostas na cavidade opercular. As unidades respiratórias, as lamelas, estão localizadas acima e abaixo do filamento.

O exame macroscópico das brânquias dos exemplares de *H. reidi* utilizados no experimento apresentou brânquias com aparência normal, ou seja, cor vermelha indicando boa vascularização e ausência de lesões. Após o processamento das amostras de tecido branquial, o exame microscópico mostrou a presença de diversas alterações histopatológicas que foram quantificadas e, então, foi determinado o grau de comprometimento funcional do órgão.

A estrutura normal e as histopatologias das brânquias encontradas *H. reidi* estão apresentadas na figura 9. As alterações histopatológicas branquiais encontradas nos animais expostos por diferentes períodos ao petróleo e suas respectivas freqüências estão apresentadas na Tabela 3.

Dentre os vários tipos de alterações que podem ser observados em brânquias, apenas alguns foram observados no presente trabalho, inclusive nos grupos controles. As alterações histopatológicas mais comuns em todos os períodos de exposição foram as de estágio de severidade I. Durante todo o experimento as alterações mais freqüentes foram hipertrofia e proliferação (hiperplasia) das células pavimentosas do epitélio lamelar, congestão vascular, descolamento epitelial e fusão das lamelas. Não foram encontradas alterações do estágio II e III.

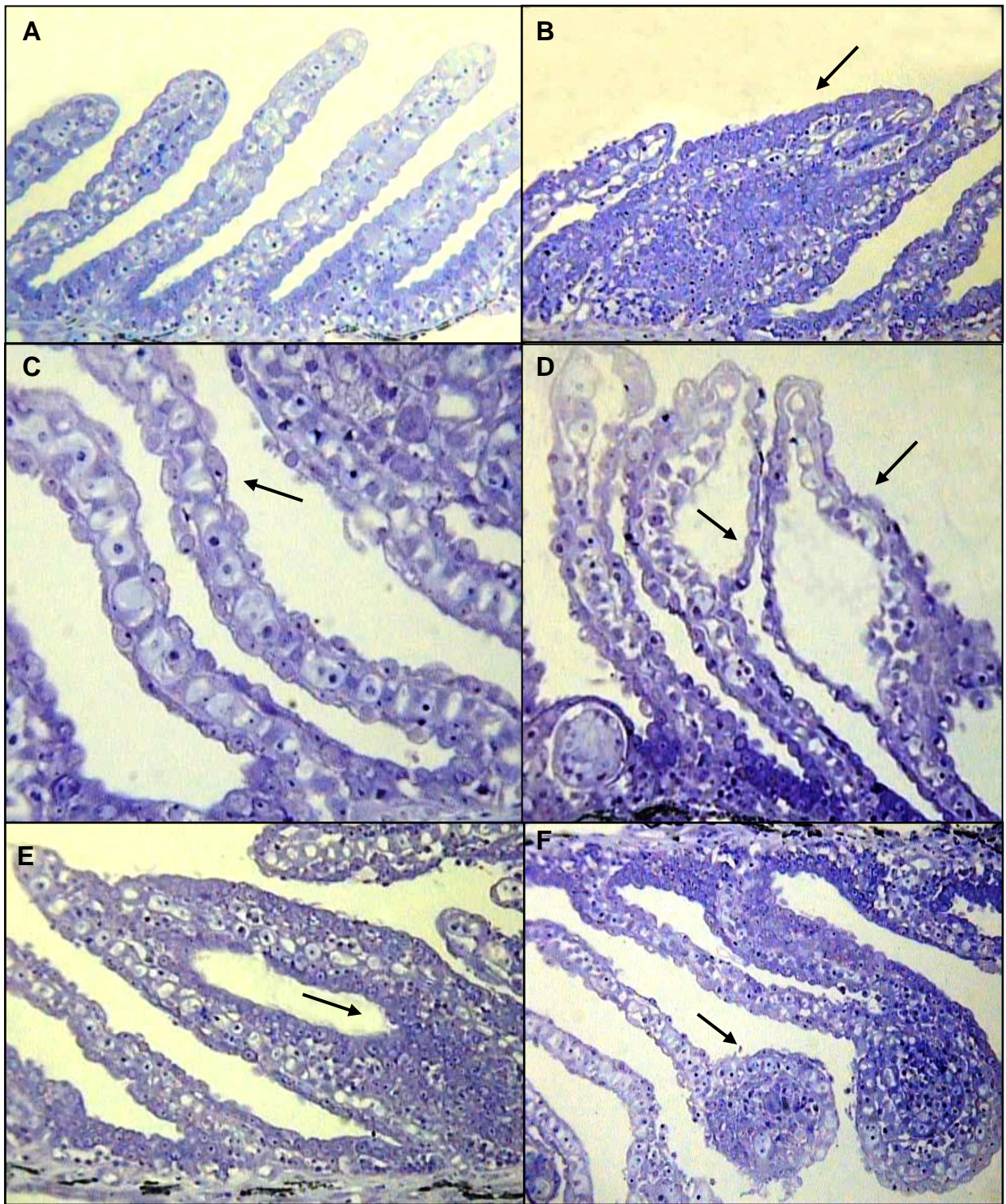
O grupo exposto por 336h ao óleo se mostrou o mais prejudicado pela exposição ao contaminante, onde todas as histopatologias presentes no estudo foram encontradas de maneira extremamente freqüente.



O experimento de recuperação demonstrou que o período de 168h (7 dias), livre do contaminante, é insuficiente para a recuperação das histopatologias encontradas em exemplares de *H. reidi* após exposição ao petróleo. Ao término dos experimentos, as freqüências das histopatologias encontradas nos indivíduos do grupo recuperação são iguais à dos indivíduos expostos ao petróleo por 96h (Tabela 3).

A análise histológica das brânquias de *H. reidi* mostrou que as alterações encontradas estão pontualmente localizadas neste órgão, já que o Valor Médio de Alteração - VMA - (Figura 10 A) ficou entre 1 e 2 para todos os períodos de exposição, não apresentando variações significativas entre eles.

O índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias (Figura 10 B) não apresentou variações significativas entre os períodos de exposição ao petróleo, exceto entre os períodos de 12h e 336h, que se mostraram diferentes estatisticamente. Entretanto, quando comparados os valores de IAH dos grupos testes com seus respectivos grupos controles, estes se mostraram significativamente superiores em todos os períodos de exposição.

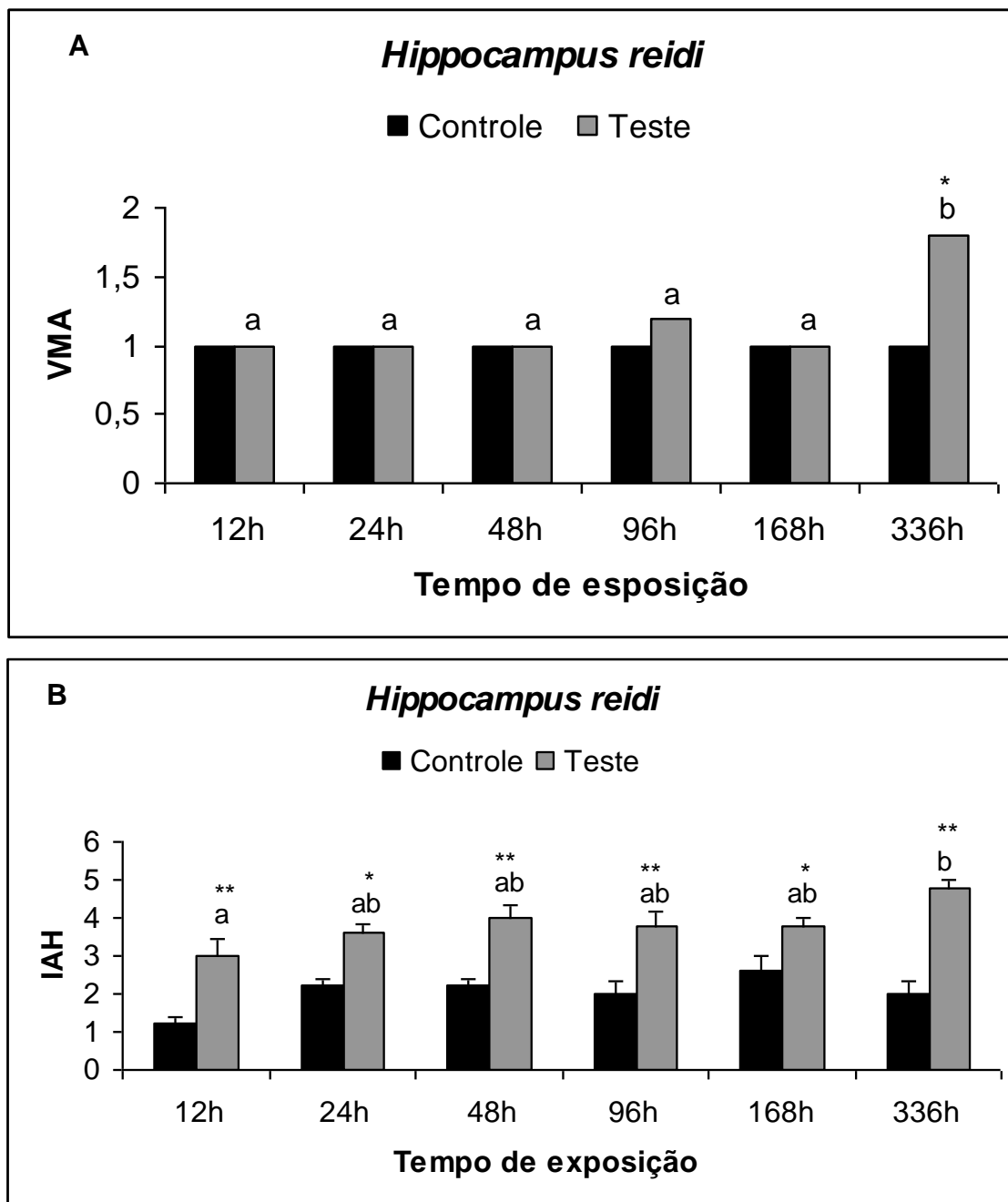


**Figura 9.** Histopatologias branquiais encontradas em *Hippocampus reidi* exposto ao petróleo na concentração de  $10\text{mL.L}^{-1}$ . **(A)** Estrutura normal da brânquia; **(B)** Fusão das lamelas; **(C)** Hipertrofia das células pavimentosas do epitélio lamelar; **(D)** Descolamento epitelial; **(E)** Hiperplasia lamelar; **(F)** Congestão vascular.

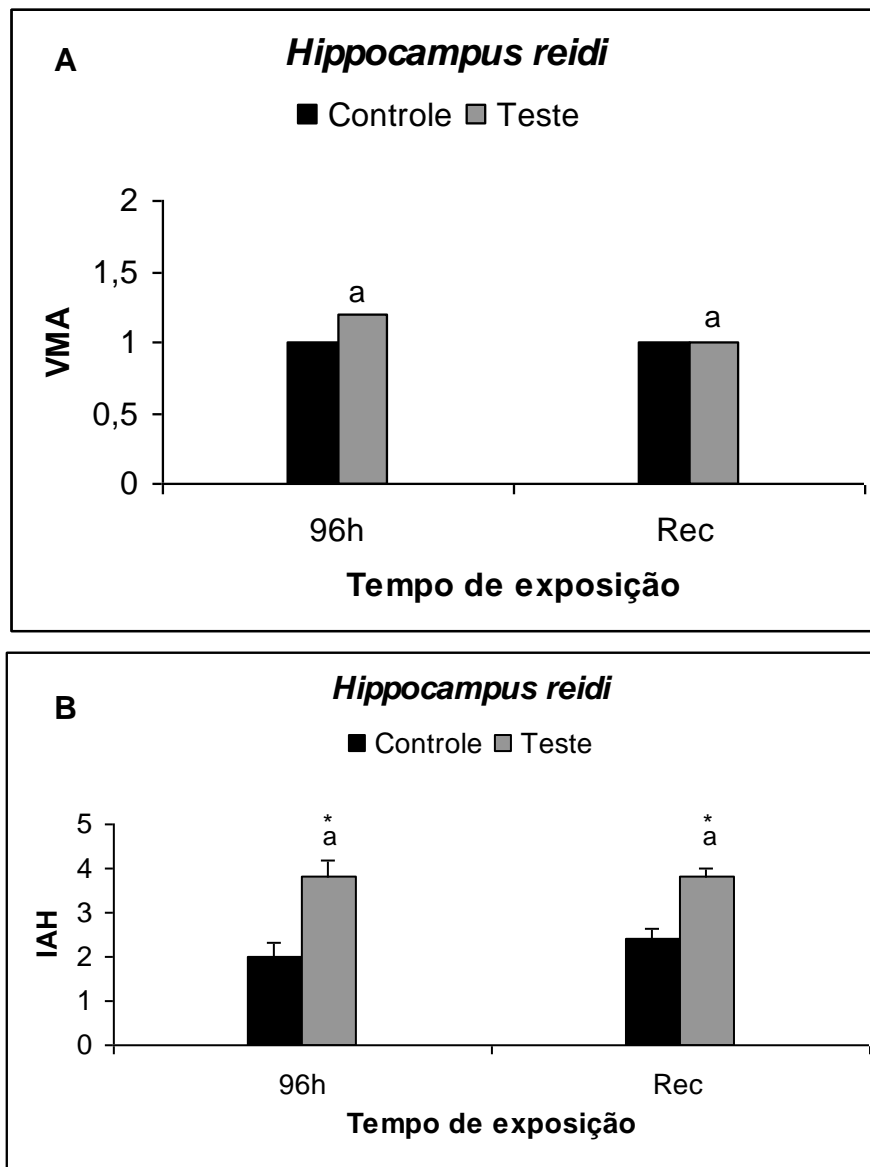
**Tabela 3.** Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h, e seus respectivos grupos controles. Além do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem o contaminante por 7 dias, e seu respectivo grupo controle.

| Estágio       | ALTERAÇÃO                       |                                 |                    |                        |                   |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------------------|-------------------|
|               | Hipertrofia do epitélio lamelar | Hiperplasia do epitélio lamelar | Congestão vascular | Descolamento epitelial | Fusão das lamelas |
| <b>C 12h</b>  | I                               | I                               | I                  | I                      | I                 |
| <b>E 12h</b>  | 0                               | 0+                              | 0                  | 0                      | 0                 |
| <b>C 24h</b>  | 0+                              | 0+                              | 0                  | 0                      | 0+                |
| <b>E 24h</b>  | +                               | +                               | 0                  | 0                      | +                 |
| <b>C 48h</b>  | 0                               | 0+                              | 0                  | 0                      | 0+                |
| <b>E 48h</b>  | +                               | +                               | 0                  | 0                      | +                 |
| <b>C 96h</b>  | 0+                              | 0+                              | 0                  | 0                      | 0+                |
| <b>E 96h</b>  | +                               | +                               | 0+                 | 0                      | +                 |
| <b>C 168h</b> | 0+                              | 0+                              | 0                  | 0                      | 0+                |
| <b>E 168h</b> | ++                              | ++                              | +                  | 0                      | ++                |
| <b>C 336h</b> | 0+                              | 0+                              | 0                  | 0                      | 0+                |
| <b>E 336h</b> | +++                             | +++                             | +++                | +++                    | +++               |
| <b>C rec.</b> | 0+                              | 0+                              | 0+                 | 0                      | 0                 |
| <b>E rec.</b> | +                               | +                               | 0+                 | 0                      | +                 |

0 = ausente; 0+ = raramente freqüente; + = freqüente; ++ = muito freqüente; +++ = extremamente freqüente



**Figura 10: (A)** Valores médios de alteração (VMA) e **(B)** índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> em seis períodos distintos: 12h, 24h, 48h, 96h, 168h e 336h, e seus respectivos grupos controles. Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. \* indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,05; \*\* indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,001.



**Figura 11: (A)** Valores médios de alteração (VMA) e **(B)** índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup> por 96h e do experimento de recuperação, onde os indivíduos foram expostos por 96h à mesma concentração de petróleo e em seguida, transferidos para aquários sem o contaminante por 7 dias, e seus respectivos grupos controles. Letras indicam diferença em relação aos diferentes períodos de exposição ao petróleo. \* indica diferença em relação ao grupo controle com p<0,05.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo, um dos mais populares e promissores testes de mutagenicidade ambiental, vem servindo como um indicativo de danos citogenéticos durante mais de 30 anos e é considerado um indicador bem estabelecido de genotoxicologia (FENECH et al., 2003; ÇAVAS et al., 2005). É uma técnica relativamente rápida e sensível na indicação de alterações estruturais, na perda de material genético, e de anomalias cromossômicas numéricas (BOLOGNESI et al., 2004). Este biomarcador em eritrócitos periféricos é uma ferramenta muito útil para monitorar os efeitos de agentes genotóxicos ambientais em peixes (LEMOS et al., 2005). Entretanto, os micronúcleos podem somente ser expressos em células eucarióticas em divisão, ou seja, o ensaio não pode ser usado eficientemente ou quantitativamente em populações de células que não estejam em divisão ou em populações de células em divisão nas quais a cinética da divisão celular não seja bem conhecida ou controlada (FENECH, 2000).

A baixa frequência de eritrócitos danificados no grupo exposto por 12h pode estar relacionada ao fato de que esse período de exposição ao óleo cru não foi suficiente para induzir danos no ciclo celular a tempo de se manifestar no momento do teste. Quanto à baixa frequência de células micronucleadas no grupo exposto por 14 dias, acredita-se que esse fator esteja relacionado com a renovação dos eritrócitos. As células sanguíneas são continuamente renovadas, e eritrócitos danificados tendem a ser eliminados do organismo mais rapidamente do que aqueles que não estão danificados (DE FLORA et al., 1993). Um resultado semelhante foi encontrado por Vanzella et al. (2007), após a exposição de exemplares de *Prochilodus lineatus* à fração solúvel do óleo diesel por 6h, 24h, 96h e 15 dias. Eles observaram que as menores frequências de micronúcleos foram encontradas nos grupos expostos por 6h e 15 dias.

Segundo Al-Sabti e Metcalfe (1995) a máxima indução de micronúcleos normalmente ocorre de um a cinco dias de exposição, concordando com os resultados de Grisolia e Cordeiro (2000), que observaram que a maior indução de micronúcleos ocorreu entre dois e sete dias pós-tratamento. Segundo os resultados

observados por estes mesmos autores foi observada tendência à diminuição da frequência de micronúcleos a partir do décimo quarto dia de exposição.

Diante disso, apesar do teste do Micronúcleo ser reportado como um biomarcador de genotoxicidade em peixes, alguns estudos de exposição crônica ou sub-crônica a poluentes, demonstraram que a frequência de eritrócitos micronucleados tende a diminuir após 15º ou 21º dia de exposição (ÇAVAS E ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; VANZELLA et al., 2007).

No presente trabalho, as maiores frequências de micronúcleos foram observadas nos indivíduos expostos ao petróleo por 96h. Isso demonstra que este período, nas condições em que ocorreu o experimento, foi o mais adequado para a avaliação de mutação em *H. reidi*, provavelmente devido ao fato de que até este intervalo de tempo, as lesões celulares que ocorreram no núcleo não foram reparadas acuradamente antes de se iniciar o processo de divisão celular, e dessa forma foram perpetuados para as células filhas, os danos (micronúcleo) induzidos nas células parentais.

As indústrias de refino de petróleo, em especial, estão entre as quatro maiores fontes de emissão de químicos tóxicos no ambiente (ar e água) nos EUA, segundo o U.S. EPA (2001), e seus despejos caracterizam-se por apresentar toxicidade alta, atribuída, na maior parte das vezes, à parte solúvel, que contém compostos inorgânicos (sais, metais pesados), e orgânicos (óleos, graxa, PAHs e BTEX) (ALMEIDA-VAL et al., 2002). Por análises químicas, foi determinada a presença de BTEX e PAHs na amostra em estudo. O histórico dessa classe de químicos revela que em populações de peixes, os PAHs presentes na água e no sedimento, estão relacionados com o aparecimento de neoplasias, demonstrando propriedades carcinogênicas (PACHECO E SANTOS, 2001; WHITE, 2002).

Muitos PAHs e seus metabólitos são conhecidos pelo seu potencial mutagênico (AAS et al., 2001) sendo considerados os compostos derivados do petróleo de maior potencial tóxico (YANIK et al., 2003). Alguns dos metabólitos produzidos por PAHs são altamente reativos e possuem uma alta afinidade com a molécula de DNA, realizando pontes covalentes com essa e resultando na formação de aductos

(PISONI et al., 2004). Embora os mecanismos para sua formação não sejam inteiramente explicados, diversos estudos indicam que as alterações morfológicas nucleares são induzidas em resposta à exposição aos agentes genotóxicos (SERRANO-GARCIA E MONTERO-MONTOYA, 2001).

Há de se considerar ainda que alguns dos compostos químicos monoaromáticos presentes no petróleo estudado no presente trabalho (benzeno e tolueno) mostraram efeitos positivos quanto à mutagenicidade, assim como em alguns estudos revisados por Ohe et al. (2004).

A genotoxicidade do petróleo foi comprovada a partir do teste do MN em eritrócitos maduros (sangue periférico) e eritrócitos imaturos (provenientes do rim cefálico) de turbot (*Scophthalmus maximus*), e em eritrócitos imaturos de bacalhau do Atlântico (*Gadus morua*) após a exposição ao petróleo. Conteúdo complementar do alquilfenóis e PAHs no tratamento com 0,5 ppm de óleo causou maior indução de MN (em eritrócitos maduros e imaturos de turbot) do que no grupo com somente 0,5 ppm de óleo. Deve-se salientar que alquilfenóis e PAHs são compostos bem conhecidos presentes em águas contaminadas a partir de plataformas de petróleo (BARSIENE et al., 2006).

No presente estudo, a avaliação da indução de micronúcleos em eritrócitos de *H. reidi* expostos ao petróleo por períodos distintos revelou que este teste é eficiente em detectar o potencial mutagênico dos compostos presentes no óleo cru, principalmente entre 48h e 168h de exposição.

## 4.2 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa detecta quebras na fita de DNA e locais álcali-labeis através da medição da migração do DNA (SINGH et al., 1988). De acordo com diretrizes internacionais, o ensaio do cometa é um método de quantificação de danos no DNA bem validado que pode ser usado com confiabilidade elevada na avaliação de alguns organismos expostos a efluentes (GRAZEFTE et al., 2008). Este ensaio oferece vantagens consideráveis sobre os outros métodos citogenéticos, por exemplo, os testes de identificação da presença de aberrações de cromossoma, da troca de cromátide irmã e até mesmo do teste do micronúcleo usados para a



detecção de dano ao DNA. Uma vez que no ensaio cometa as células não precisam estar em fase mitótica ativa, é possível sua utilização em qualquer tecido de interesse, além de sua relativa facilidade e a geração de dados ao nível celular individual (ANDRADE et al., 2004). A avaliação dos danos do DNA através do Ensaio Cometa tem sido considerada um método eficaz para o monitoramento dos efeitos de PAHs, como comprovado neste estudo, assim como tem sido eficaz na detecção de danos gerados por PAHs e outros compostos xenobióticos (PADRANGI et al., 1995; STEINERT et al., 1998; AAS et al., 2000).

Exposições a agentes genotóxicos, presentes no meio aquático, podem levar a perda da integridade do DNA (ROJAS et al., 1999), como demonstrado no presente estudo pelo alto índice de quebras, resultando em cometas de classes I e II encontradas no material genético dos eritrócitos de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo. Mitchelmore et al. (1998), também observaram em células de hemolinfa de *Mytilus edulis*, quebras em DNA devido à exposição à xenobiontes como PAHs. Laffon et al. (2006), também observaram aumento significativo de quebras de DNA em tecidos branquiais de *Mytilus galloprovincialis* no monitoramento do naufrágio do petroleiro *Prestige* na costa da Galícia. Também foram detectados danos pelo ensaio cometa em hepatócitos de *Salmo trutta*, expostos ao benzo[a]pireno e ao nitropireno (MITCHELMORE E CHIPMAN, 1998).

O processo de biotransformação dos PAHs em peixes, contrariamente ao que ocorre com a maioria dos compostos químicos, muitas vezes converte estes xenobióticos em intermediários reativos altamente tóxicos que podem causar dano oxidativo ao DNA (VAN DER OOST et al., 2003). Embora os diferentes organismos sejam dotados de um sistema de defesa intracelular e extracelular para proteger os tecidos contra a lesão oxidativa provocada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), se a velocidade de produção dos radicais livres exceder a capacidade dos mecanismos de defesa, ocorre a lesão celular (CADET et al, 2003). Vanzella et al. (2007), atribuem os danos genéticos observados para *P. lineatus*, submetidos à exposição aguda (6, 24 e 96h) e subcrônica (15) dias à fração solúvel do óleo diesel, aos processos oxidativos resultantes da metabolização de hidrocarbonetos monoaromáticos e poliaromáticos presentes nesta fração do óleo. Assim, é possível supor que o aumento de danos no DNA de eritrócitos de *H. reidi*, detectado pelo ensaio cometa em todos os períodos

de exposição ao óleo cru pode estar relacionado à metabolização do mesmo, a qual poderia ter gerado espécies reativas de oxigênio (ERO), que agiram sobre o DNA dos animais expostos, resultando nas lesões detectadas pelo ensaio cometa.

No presente estudo o ensaio cometa demonstrou ser mais sensível ao contaminante em relação ao teste do micronúcleo, uma vez que conseguiu determinar um elevado índice de danos no material genético de *H. reidi* com apenas 12h de exposição e mesmo após 168h de exposição. De acordo com os resultados obtidos através do teste do micronúcleo, o período de 168h revelou ser o que mais causa danos mutagênicos nos organismos expostos a ele. Kim e Hyun (2006) ao comparar os resultados dos testes de micronúcleo e ensaio cometa em organismos aquáticos verificaram elevada concordância entre os ensaios, com maior sensibilidade do ensaio cometa frente a dois diferentes agentes mutagênicos (N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina e benzopireno), concordando com Hartmann et al. (2001), Dixon et al. (2002), Klobucar et al. (2003) e com o presente trabalho.

A avaliação da recuperação de animais após exposição a efluentes é fundamental para saber o grau de dano sofrido no organismo e suas conseqüências. Quando a recuperação é mais rápida indica danos leves ocorridos e que o organismo foi capaz de se defender como descrito por Amado et al. (2006). No entanto quando há lentidão na recuperação indica que esse organismo foi seriamente afetado, podendo ter atingido não apenas os níveis mais baixos da organização biológica (molecular e bioquímico), mas também os níveis fisiológicos e morfológicos.

Para avaliar se os danos produzidos após a exposição de 96h ao petróleo eram reparáveis, os animais foram transferidos para aquários contendo água sem o contaminante, durante 168h (7 dias), o qual mostrou ser suficiente para a correção dos danos genotóxicos observados, visto que os resultados obtidos para estes indivíduos, tanto com relação ao ID quanto em relação aos níveis de classes de danos, foram significativamente menores quando comparados aos animais expostos por 96h ao petróleo.

Tendo conhecimento da presença de agentes potencialmente genotóxicos neste contaminante, uma das hipóteses para justificar esta recuperação seria o reparo por

excisão de nucleotídeos de aductos que tenham sido introduzidos por alguns dos componentes do petróleo. Esta via de reparo é conhecida por envolver a retirada de um fragmento de DNA em torno da lesão e se constitui na principal via de reparo de danos induzidos por PAHs (SCICCHITIANO, 2005).

Este trabalho mostrou que *Hippocampus reidi* fornece respostas de genotoxicidade e de recuperação de danos avaliados pelo ensaio cometa, podendo ser considerado um bom indicador de toxicidade.

### 4.3 HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS

Análises histopatológicas têm sido reconhecidas como ferramentas muito úteis no estudo e diagnóstico dos efeitos agudos e crônicos de poluentes em teleósteos (AKAISHI et al., 2004; OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2002a, 2002b, 2005). Além disso, as características histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (SCHMALZ et al., 2002). Sendo assim aparecem como uma resposta a estressores subletais fornecendo um método rápido na avaliação do comprometimento de tecidos e órgãos de espécimes expostos a agentes químicos estressores (JOHNSON et al., 1993).

As brânquias dos peixes são órgãos essenciais por ser nelas que ocorre a respiração desses animais. A obtenção adequada de oxigênio do meio aquático é importante para o metabolismo aeróbico. Além da função relacionada à respiração, esses órgãos têm importante papel na regulação iônica e osmótica, na excreção de produtos nitrogenados e no equilíbrio ácido-base. Devido à grande extensão da superfície branquial, a distância água-sangue muito pequena (4-7  $\mu\text{m}$ ) e ao grande volume de água que passam sobre as brânquias para a obtenção do oxigênio, as brânquias são, um dos principais órgãos alvos de todas as substâncias dissolvidas na água, as quais podem facilmente penetrar no organismo por difusão (FERNANDES et al., 2003, 2007).

Para todos os grupos expostos ao petróleo no presente trabalho, os danos descritos foram classificados como leves, não caracterizando risco à sobrevivência dos

indivíduos, por serem pontuais e reversíveis. Apesar disso, os indivíduos que apresentam essas alterações se tornam mais vulneráveis em situações como a necessidade de fuga ou de captura de alimento, uma vez que apresentam uma redução na capacidade de oxigenação sanguínea. Deve-se ressaltar, entretanto, que o grupo que participou do experimento de recuperação, não demonstrou uma redução significativa das freqüências histopatológicas encontradas em relação ao grupo exposto por 96h ao contaminante, revelando que o período de 7 dias livre do contaminante, foi insuficiente para reverter o quadro de danos nos tecidos branquiais.

As alterações identificadas nas brânquias de *H. reidi* são denominadas respostas de defesa (inflamatórias) ou compensatórias (proliferação celular) à ação de substâncias presentes na água. Ambas as respostas auxiliam a reduzir a entrada dessas substâncias no organismo e a prevenir possíveis danos que possam ser causados, direta ou indiretamente por elas. Entretanto, essas alterações, se muito intensas, podem resultar em distúrbios respiratórios com conseqüente redução da absorção de oxigênio e desequilíbrio hidroeletrolítico (SIMONATO et al., 2006; FERNANDES et al., 2003).

A proliferação celular no filamento (hiperplasia) reduz a superfície das lamelas disponíveis para a troca de gases respiratórios (oxigênio e gás carbônico) (MAZON et al., 2002). Em algumas regiões do filamento a proliferação celular acarretou na fusão total de grupos de lamelas, o que contribui para a redução da superfície respiratória. O descolamento do epitélio lamelar, outra alteração histopatológica comum nas brânquias de *H. reidi* estudadas deve-se, em geral, à formação de edemas que é o deslocamento do plasma do interior dos vasos sanguíneos para o epitélio lamelar e promovem um aumento da distância de difusão entre a água e o sangue (CERQUEIRA E FERNANDES, 2002, MAZON et al., 2002, SAKURAGUI et al., 2003).

Engelhardt et al. (1981) observaram descolamento epitelial e fusão lamelar em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta à resíduos de petróleo. Alterações similares também foram relatados nas brânquias de peixes expostos à metais traço (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2000, CERQUEIRA E FERNANDES, 2002; MARTINEZ et al, 2004) e à contaminantes orgânicos (ROSETY-RODRÍGUEZ et al., 2002; FANTA et al., 2003). Segundo Mallat (1985), tais alterações não

são específicas e podem ser induzidas por diferentes tipos de contaminantes. Como conseqüência do aumento da distância entre água e sangue, devido à dilatação epitelial, o consumo de oxigênio é prejudicado. No entanto, os peixes têm a capacidade de aumentar a sua taxa de ventilação, para compensar o consumo de oxigênio baixo (FERNANDES E MAZON, 2003). A ocorrência de proliferação celular e fusão das lamelas em áreas contaminadas por múltiplos xenobiontes incluindo PAHs, também foi observada por Stentiford et al. (2003).

A maior parte das lesões branquiais decorrentes de exposições sub-crônicas afeta o epitélio lamelar; entretanto, algumas alterações em vasos sangüíneos também podem ocorrer, quando peixes sofrem um tipo mais severo de estresse. Nesse caso, células pilares danificadas podem resultar em um fluxo sangüíneo aumentado dentro das lamelas, causando dilatação do canal marginal e, conseqüentemente congestão sangüínea (SIMONATO et al., 2006). A congestão vascular reduz a transferência de oxigênio da água para os eritrócitos resultando em uma redução na absorção de oxigênio e na liberação do gás carbônico que pode alterar o equilíbrio ácido-base e a absorção de íons do meio (SIMONATO et al., 2006; CAMARGO E MARTINEZ, 2007).

Alterações branquiais como desorganização das lamelas secundárias, proliferação celular, descolamento de epitélio branquial, fusão lamelar, descolamento de epitélio e hiperplasias em peixes expostos ao petróleo ou seus derivados já foram descritas em trabalhos prévios (SPIES et al., 1996; NERO et al., 2006; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Rudolph et al. (2001) constataram em brânquias de *Oncorhynchus mykiss* expostos a hidrocarbonetos de petróleo, descolamentos de epitélio e hipertrofia celular nas bases das lamelas, assim como constatado em microscopia de luz neste trabalho.

Os resultados obtidos no atual trabalho com a exposição de *H. reidi* exposto ao petróleo na concentração de 10mL.L<sup>-1</sup>, revelam que este contaminante não provocou toxicidade suficiente capaz de modificar o epitélio branquial de forma irreversível em nenhum dos períodos de exposição, como demonstrado pelo índice de alteração histopatológica (IAH). Embora tenham sido encontradas lesões nas brânquias de todos os exemplares expostos aos diferentes períodos de tempo ao petróleo, estas foram classificadas como leves e reversíveis. Os índices calculados de IAH foram menores do que dez, o que indica que apesar das histopatologias observadas, as

brânquias apresentavam função normal. De acordo com Cengiz e Unlu (2006), os níveis de alterações branquiais variam de acordo com o efluente utilizado e o prazo de exposição.

Rombough (2007) descreve a hipótese que mesmo apresentando contato direto com o meio externo, as brânquias apresentam proteção maior do opérculo, variando em fases de vida dos indivíduos e espécie. Característica essa bem evidente na morfologia de *H. reidi* que além da proteção do opérculo apresenta uma pequena membrana que diminui o contato com as substâncias xenobióticas presentes na água. Este fator pode ter influenciado nos resultados encontrados no presente trabalho, fazendo com que apenas poucas alterações fossem encontradas nas brânquias dos indivíduos expostos e todas elas com estágio de severidade I.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise conjunta dos resultados apresentados neste trabalho demonstra de forma incontestável o potencial genotóxico e mutagênico dos componentes do petróleo em indivíduos de *Hippocampus reidi* expostos a ele;

A genotoxicidade do petróleo se mostrou passível de reparo em um período de tempo relativamente curto na espécie *Hippocampus reidi*,

O período de exposição ao petróleo foi insuficiente para provocar danos severos nas brânquias de *Hippocampus reidi*, uma vez que as mesmas apresentaram função normal de suas estruturas. Após o experimento de recuperação, não houve uma mudança significativa dos resultados

As lesões observadas pelas análises histopatológicas também não puderam ser recuperadas após

Embora tenha sido observadas alterações morfológicas nas brânquias de *Hippocampus reidi* expostos ao petróleo, as mesmas apresentaram função normal, o que indica que nas condições em que ocorreu este experimento, o petróleo não foi capaz de provocar danos severos neste órgão, entretanto, os danos morfológicos observados pela histopatologia de brânquias não puderam ser recuperados

A espécie *Hippocampus reidi* mostrou-se um organismo capaz de expressar os efeitos tóxicos de componentes do petróleo, como PAHs, comportando-se satisfatoriamente como uma espécie bioindicadora para o presente estudo.

## 6 REFERÊNCIAS

AAS, E.; BAUSSANT, T.; BALK, L.; LIEWENBORG, B.; ANDERSEN, O.K. PAH metabolites in bile, cytochrome P450 1A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquatic Toxicology**, v. 51, p. 241–258, 2000.

AAS, E.; BEYER, J.; JONSSON, G.; REICHERT, W.L.; ANDERSEN, O.K. Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 213–229, 2001.

AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; EIRAS-STOFELLA, D. R.; ST-JEAN, S. D.; COURTENAY, S. C.; LIMA, E. F.; WAGENER, A. L. R.; SCOFIELD, A. L.; RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 46, p. 244–253, 2004.

ALBERS, P.H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. JR.; CAIRNS, J. JR. (Ed). **Handbook of Ecotoxicology**. Florida: Boca Raton, 2002. p. 341–371.

ALMEIDA – VAL, V. M. F.; DUNCAM, W. P.; VAL, A. L. Crude oil effects on fish of the amazon: Current Status. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; MCKINLEY, D.



(Ed) **Tropical fish**: news and reviews. International Congress on the Biology of fish. Vancouver: University Of British Columbia, 2002. p.49.

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

AMADO, L. L.; ROBALDO, R. B.; GERACITANO, L.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 207–213, 2006.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp*) and sea catfish (*Netuma sp*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v. 560, p. 57-67, 2004.

BARSIENE, J.; DEDONYTE V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKENAITE, L.; ANDERSEN, O. K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 99-104, 2006.

BOLOGNESI, C.; BUSCHINI, A.; BRANCHL, E.; CARBONI, P.; FURLINI, M.; MARTINO, A.; MONTEVERDEA, M.; POLI, P.; ROSSI, C. Comet and micronucleus assay in zebra fish mussel cell for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Science of the Total Environment**, v. 333, p. 127-136, 2004.

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

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 327-336, 2007.

CASEY, S. P.; HALL, H. J.; HELEN, F.; STANLE, H. F.; VINCENT, A. C. J. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, p.261-272, 2004.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264–71, 2005.

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.

CAVAS, T.; KONEN, S. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 154-159, 2008.

CENGİZ, E. I.; UNLU, E. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 200-204, 2006.

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

DE FLORA, S.; VIGANO, L.; AGOSTINI, F.D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, v. 319, p. 167-177, 1993.

DIAZ, A. O.; GARCIA, A. M.; DEVINCENZI, C. V.; GOLDEMBERG, A. L. Ultrastructure and histochemical study of glycoconjugates in the gills of the white croaker (*Micropogonias furnieri*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 34, p. 117-122, 2005.

DIXON, D. R.; PRUSKI, A. M.; DIXON, L. R.; JHA, A. N. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v. 17, p. 495-507, 2002.

ENGELHARDT, F. R.; WONG, M. P.; DUEY, M. E. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water as affected by petroleum exposure. **Aquatic Toxicology**, v.1, p. 175-186, 1981.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 119-130, 2003.

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

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.

FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Ed). **Fish Adaptation**. Enfield: Science Publishers, 2003, 418 p.

FERNANDES, M. N.; MORON, S. E.; SAKURAGUI, M. N. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In: FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T.; GLASS, M. L.; KAPOOR, B. G (Ed). **Fish Respiration and Environment**. Enfield: Science Publishers, 2007, 392 p.

GONZALEZ-DONCEL, M.; GONZALEZ, L.; FERNANDEZ-TORIJA, C.; NAVAS, J. M.; TARAZONA, J. V. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 4, p. 280–288, 2008.

GRAZEFTE, V. S.; TALLARICO, L. F.; PINHEIRO, A. S.; KAWANO, T.; SUZUKI, M. F.; KAYO OKAZAKI, K.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research**, v. 654, p. 58–63, 2008.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 235-239, 2000.

GRISOLIA, C. K.; OLIVEIRA, A. B. B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p. 334-338, 2005.

HAMOUTENE, D.; PAYNE, J. F.; RAHIMTULA, A.; LEE, K. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 471– 474, 2002.

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

HEUSER, V. D.; ANDRADE, V. M.; PERES, A.; BRAGA, L. M. G. M.; CHIES, J. A. B. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by

Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**, v. 32, p. 1223-1229, 2008.

INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function precede morphological anomalies in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, p. 191–205, 2004.

JOHNSON, L. L.; CASILLAS, E.; SOL, S.; COLLIER, T.; STEIN, J.; VARANASI, U. Contaminant effects on reproductive success in selected benthic fish. **Marine Environmental Research**, v. 35, p. 165–170, 1993.

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

KLOBUCAR, G. I. V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 15- 23, 2003.

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

LAFFON, B.; RÁBADE, T.; PÁSARO, E.; MÉNDEZ, J. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. **Environmental International**, v. 32, p. 342–348, 2006.

LEE, R. F.; ANDERSON, J. W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 705–723, 2005.

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.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences**, v. 42, p. 630-648, 1985.

MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, p. 797-807, 2004.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research**, v. 88, n. 1, p. 52-63, 2002.

MITCHELMORE, C. L.; BIRMELIN, C.; CHIPMAN, J. K.; LIVINGSTONE, D. R. Evidence for cytochrome P450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. **Aquatic Toxicology**, v. 41, p. 193–212, 1998.

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.

NERO, V.; FARWELL, A.; LISTER, A.; VAN DER KRAAK, G.; LEE, L. E. J.; VAN MEER, T.; MACKINNON, M. D.; DIXON, D. G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, p. 365-377, 2006.

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

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER, E.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental Research**, v. 90, p. 217–225, 2002b.

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

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, P. H.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 161–167, 2002a.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals

in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53–69, 2005.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 64–75, 2001.

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

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SHENEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. Ecotoxicologia e avaliação de risco do Petróleo. **Série Cadernos de Referência Ambiental**, Salvador-BA, v. 12, p. 229, 2002.

PEREZ, C.; VELANDO, A.; MUNILLA, I.; LOPEZ-ALONSO, M.; ORO, D. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in the marine environment after the prestige oil spill by means of seabird blood analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 3, p.707–713, 2008.

PISONI, M.; COGOTZI, L.; FRIGERI, A.; CORSI, I.; BONACCI, S.; IACocca, A.; LANCINI, L.; MASTROTOTARO, F.; FOCARDI, S.; SVELTO, M. DNA adducts, benzo[a]pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). **Environmental Research**, v. 96, p. 163–175, 2004.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, c. 30, p. 339 – 352, 1994.

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.

ROMBOUGH P. The functional ontogeny of the teleost gill: Which comes first, gas or ion exchange? **Comparative Biochemistry and Physiology** - Part A, v. 148, p. 732-742, 2007.

ROSA, I. M. L.; ALVES, R. R. N.; BONIFÁCIO, K. M.; MOURÃO, J. S.; OSÓRIO, F. M.; OLIVEIRA, T. P. R.; NOTTINGHAM, M. C. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. **Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, 2005.

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F. J.; ROSETY, M.; ROSETY, J. M.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 223-228, 2002.

RUDOLPH, A.; YANEZ, R.; TRONCOSO, L. Effects of Exposure of *Onchorhynchus mykiss* to the Water Accomodated Fraction of Petroleum Hydrocarbons. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, p. 400–406, 2001.

SAKURAGUI, M. M.; SANCHES, J. R.; FERNANDES, M. N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 173, p. 309-317, 2003.

SCHMALZ, W. F.; HERNANDEZ, A. D.; WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 539–542, 2002.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopatological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 75 – 86, 1997.

SCICCHITIANO, D. A. Transcription past DNA adducts derived from polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutation Research**, v. 577, p. 146-154, 2005.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTEIRO MONTAYA, R. Micronuclei and cromatid buds are the result of related genotoxic events. **Enviromental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, p. 38-45, 2001.

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 the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, p. 505–511, 2006.

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

SPIES, R. B.; STEGEMAN, J. J.; HINTON, D. E.; WOODIN, B.; SMOLOWITZ, R.; OKIHIRO, M.; SHEA, D. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara channel. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 195–219, 1996.

STEINERT, S. A.; STREIB-MONTEE, R.; LEATHER, J. M.; CHADWICK, D. B. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutation Research**, v. 399, p. 65–85, 1998.

STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, p. 137-159, 2003.

TESKE, P. R.; LOCKYEA, J. F.; HECHT, T.; KAISER, H. Does the endangered Knysna seahorse, *Hippocampus capensis*, have a preference for aquatic vegetation type, cover or height? **African Zoology**, v. 42, 2007.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p. 206-22, 2000.

U.S. EPA - Environmental Protection Agency. **1999 Toxics Release Inventory Public Data release**. 2001. Disponível em:  
<<http://www.epa.gov/triexplorer/industry.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2009

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

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v. 63, p. 36–43, 2007.

VARANASI, U.; REICHERT, W. L.; LE EBERHART, B. T.; STEIN, J. E. Formation and persistence of benzo(a)pyrene-diolepoxide DNA adducts in liver of English sole (*Paraphrys vetulus*). **Chemico-Biological Interactions**, v. 69, p. 203-216, 1989.

VIEIRA, F.; GASPARINI, J. L. Os peixes ameaçados de extinção no estado do Espírito Santo. In: PASSAMANI, M.; MENDES, S. L. (Org.) **Espécies da fauna**



**ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo.** Vitória: IPEMA, 2007. p. 87-104.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology.** Bristol: Taylor & Francis, 1996.

WENG, Y.; ZHENG, W. Y.; YU, Q. Effects of fuel oil exposure on the activity of sedium-dependent glutathione peroxidase in viscera mass of *Pagrosomus major* larva. **Acta Scientiac Circumstantiae**, v. 20, n. 1, p. 91–94, 2000.

WHITE, P. A. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex misture. **Mutation Research**, v. 515, p. 85-98, 2002.

WINKALER, E. U.; THIAGO, R. M.; SANTOS, T. R. U.; JOAQUIM; G.; MACHADONETO, J. G.; MARTINEZ, C. B. R. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, p. 236–244. 2007.

YANIK, P. J.; O'DONNELL, T. H.; MACKO, S. A.; QIAN, Y.; KENNICUTT, I.; MAHLON, C. The isotopic compositions of selected crude oil PAHs during biodegradation. **Organic Geochemistry**, v. 34, n. 2, p. 291–304, 2003.

ZHOU, Q. X.; KONG, F. X.; ZHU, L. **Ecotoxicology: principles and methods.** Beijing: Science Press, 2004. p.161–217.

