

TESTE DO MICRONÚCLEO E ENSAIO COMETA EM TILÁPIAS E CARPAS COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS

Bárbara Lidiane Kummer Mallmann

Carina Zuppa

Tiago Mateus Andrade Vidigal

Resumo

Este estudo teve como objetivo utilizar o teste do micronúcleo e o ensaio cometa em espécies de peixes (tilápia e carpa) para identificar danos ao material genético decorrentes da contaminação de ambientes aquáticos por efluentes de atividades agroindustriais. No total, foram avaliadas 44 amostras de sangue (22 tilápias e 22 carpas). Foi possível identificar danos ao material genético nas espécies estudadas. A maioria dos cometas observados apresentou dano classe 0. As amostras totais de carpas e tilápias apresentaram danos classificados como classe 1. O grau de dano 2 esteve presente em 68,2% das carpas e 89,37% das tilápias. Aproximadamente 40% das carpas e 32% das tilápias apresentaram dano classe 3. Nas carpas, os escores do ensaio cometa foram significativamente maiores em comparação ao grupo controle. Os resultados sugerem a presença de substâncias genotóxicas nos ambientes avaliados, reforçando a necessidade de estudos mais abrangentes, em condições laboratoriais controladas e com análise da qualidade da água, para identificação dos poluentes, além da adoção de medidas educativas e de controle visando à redução da poluição ambiental. Palavras-chave: água; genototoxicidade; peixes.

1 INTRODUÇÃO

O ambiente aquático é um dos ecossistemas que mais sofre impactos decorrentes da ação antrópica, uma vez que constitui o compartimento final

de diversos produtos gerados pelas atividades humanas. O descarte de resíduos industriais e domésticos, aliado ao uso intensivo de pesticidas na agricultura, contribui para a formação de produtos persistentes que afetam negativamente esse ecossistema (Akaishi et al., 2004).

A preocupação com a qualidade de vida humana e com as questões ambientais motivou a busca por indicadores biológicos que permitam o estudo dos efeitos genotóxicos e mutagênicos causados por diferentes substâncias químicas liberadas no ambiente (Nehls e Segner, 2005).

Em organismos aquáticos, a análise de alterações no DNA mostrou-se um método eficaz para avaliar a contaminação ambiental por agentes genotóxicos, uma vez que é capaz de detectar a exposição em uma ampla variedade de espécies, possibilitando a avaliação dos impactos sem a necessidade de conhecimento prévio das propriedades físico-químicas dos contaminantes presentes (Frenzilli et al., 2009).

A presença de lesões na molécula de DNA serve como indicativo da existência de substâncias genotóxicas em ambientes contaminados (Kammann et al., 2001), sendo o teste do micronúcleo e o ensaio cometa ferramentas eficazes quando utilizados de forma complementar para a identificação dessas lesões, utilizando peixes como organismos biomarcadores (Frenzilli et al., 2009).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo empregar o teste do micronúcleo e o ensaio cometa em espécies de peixes, tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*Cyprinus carpio*), como biomarcadores de poluição hídrica por efluentes de atividades agroindustriais rurais no município de São Miguel do Oeste.

2 DESENVOLVIMENTO

Delineamento Experimental

O estudo foi delineado segundo um modelo de pesquisa transversal. As amostras foram coletadas em estabelecimentos rurais no município de São Miguel do Oeste, localizado no extremo oeste de Santa Catarina (26°43'31" S, 53°31'05" W). O município possui área de 236,2 km² e altitude de 645 m. A

população rural dedica-se principalmente à agricultura e à suinocultura, em sua maioria desenvolvidas em pequenas propriedades familiares.

Os ensaios cometa e os testes do micronúcleo foram realizados em amostras de peixes das espécies carpa (*Cyprinus carpio*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*). Foram visitados 22 estabelecimentos rurais, sendo coletada, em cada um, uma amostra de sangue de cada espécie. A escolha dessas espécies deve-se ao fato de serem amplamente cultivadas na maioria das propriedades rurais da região. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste de Santa Catarina, sob o protocolo nº 19/2015.

Coleta e Armazenamento do Material

Para os testes de genotoxicidade, foram coletados 1 mL de sangue de cada animal. As amostras foram obtidas nas propriedades rurais e, após identificação, encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da UNOESC – São Miguel do Oeste para posterior análise.

Ensaio Cometa

Para a realização do ensaio cometa, utilizou-se o protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Lâminas de microscopia limpas foram recobertas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal (NMP) a 1,5% e deixadas para secagem durante a noite. Sobre essas lâminas foram depositados 5 µL de sangue, misturados a 90 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 0,75%, mantida a 37 °C. Em seguida, foi colocada uma lamínula sobre cada lâmina. Após 15 minutos sob refrigeração, a lamínula foi removida e as lâminas incubadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) por um período de 2 horas até, no máximo, 24 horas.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em solução desnaturante (30 mM NaOH, 1 mM EDTA), pH > 13, previamente resfriada entre 5 e 8 °C. A eletroforese foi realizada a 1,19 V/cm e 300 mA por 20 minutos. Após a eletroforese, procedeu-se à neutralização (392 mM Tris) por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram fixadas (15% CCl_3COOH ; 5% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5% glicerol) por 10 minutos. A coloração foi realizada com nitrato de prata,

conforme o protocolo de Nadin et al. (2001). Para a coloração, utilizaram-se duas soluções: a primeira com carbonato de sódio a 5% e a segunda contendo nitrato de amônio 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido tungstosilícico 0,25% e formaldeído 0,15%, por no mínimo 30 minutos ou até atingir a coloração desejada.

Foram analisadas 100 células por lâmina, classificadas em cinco classes de dano previamente estipuladas: 0, 1, 2, 3 e 4. Após a obtenção da frequência das classes de dano para cada indivíduo, calculou-se a soma dos escores, multiplicando-se o número de células em cada classe pelos valores 0, 1, 2, 3 e 4, correspondentes aos respectivos graus de lesão. Para validação do ensaio cometa, foram utilizadas amostras de sangue humano como controle negativo, submetidas ao mesmo tratamento das amostras testadas e classificadas segundo os critérios propostos por Andrade et al. (2004).

Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi realizado em eritrócitos periféricos maduros, conforme o protocolo descrito por de Lemos et al. (2001). No Laboratório de Biologia Molecular da UNOESC, foram utilizados 5 µL de cada amostra de sangue para confecção das lâminas por esfregaço. As lâminas permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas para secagem e, posteriormente, foram fixadas em metanol P.A. por 2 minutos e coradas imediatamente com Giemsa a 10%, em tampão fosfato pH 6,8, por 10 minutos.

Para cada amostra, foram analisados 2.000 eritrócitos em microscópio óptico com aumento de 1000X. Os resultados foram expressos como número de micronúcleos por 2.000 células e em porcentagem. Apenas micronúcleos isolados, com coloração semelhante ao núcleo principal e tamanho inferior a 1/3 deste, foram contabilizados.

Análise Estatística

Os dados foram organizados em banco de dados (Microsoft Excel) e submetidos à análise descritiva, sendo apresentados na forma de frequências (variáveis qualitativas) e média \pm desvio padrão (variáveis quantitativas). A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6®. A comparação entre médias foi precedida pelo teste de normalidade de

Kolmogorov-Smirnov, com correção de Lilliefors. Como os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos, considerando-se significativo $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, é um método quantitativo para mensurar danos ao material genético em células eucarióticas. O teste baseia-se no padrão de migração dos fragmentos de DNA em um campo eletroforético em lâmina, posteriormente visualizado em microscopia de luz ou imunofluorescência. Ao microscópio, a célula adquire a aparência de um cometa, com uma cabeça correspondente à região nuclear e uma cauda formada por fragmentos de DNA que migram em direção ao ânodo (Hartmann et al., 2003; Singh et al., 1988). Esses fragmentos resultam de lesões na molécula de DNA decorrentes da ação de agentes genotóxicos (Bombal et al., 2001). A medida mais utilizada na classificação dos cometas é o comprimento da cauda, o qual, segundo Singh et al. (1998), é proporcional ao nível de quebras na molécula de DNA.

O ensaio cometa pode ser aplicado na investigação da genotoxicidade de produtos biocidas, pesticidas, fármacos, entre outros. Suas principais vantagens incluem a possibilidade de aplicação em praticamente qualquer tecido, a detecção de múltiplas classes de danos ao DNA e a geração de dados em nível de célula individual (Hartmann et al., 2003). Em função dessa versatilidade, o ensaio tem sido amplamente utilizado em estudos ecológicos e genotóxicos em diferentes ambientes e espécies (Liao et al., 2009).

O ensaio é capaz de detectar genotoxinas inespecíficas em estudos conduzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em modelos *in vivo*, os peixes constituem excelente fonte de material para estudos genotóxicos em ambientes aquáticos, por serem organismos vertebrados capazes de metabolizar, concentrar e armazenar poluentes provenientes do ambiente (Rajaguru et al., 2003; Grisolia e Lamb, 2000). Além disso, ocupam diferentes níveis tróficos e respondem à presença de mutágenos mesmo em baixas

concentrações (Goksoyr et al., 1991). Contudo, devido à grande variabilidade interlaboratorial dos resultados, o teste deve ser rigorosamente validado (Henderson et al., 1998).

No presente estudo, buscou-se identificar danos genotóxicos decorrentes da interação entre efluentes de atividades agroindustriais e ambientes aquáticos, avaliando amostras de carpas e tilápias cultivadas em tanques próximos às lavouras. As espécies foram escolhidas por serem amplamente cultivadas na região estudada, caracterizada por intensa atividade agroindustrial e por figurar entre as principais produtoras de suínos do Brasil (Epagri, 2015).

Em ambas as análises, a maioria dos cometas observados apresentou dano classe 0, com médias de 57,32 ($\pm 19,4$) para carpas e 64,45 ($\pm 17,4$) para tilápias. As amostras totais de carpas e tilápias apresentaram danos classe 1, com médias de 31,09 ($\pm 10,3$) e 31,18 ($\pm 13,7$), respectivamente. Lesões de grau 2 estiveram presentes em 68,2% das carpas e 89,37% das tilápias, correspondendo a médias de 8,73 ($\pm 5,13$) e 7,1 ($\pm 6,9$). Aproximadamente 40% das carpas e 32% das tilápias apresentaram lesões de grau 3, com médias de 1,95 ($\pm 3,3$) e 1,45 ($\pm 2,9$), respectivamente.

Ao comparar as classes de dano de ambas as espécies com o controle negativo, observou-se que este apresentou maiores taxas de lesões classe 0, porém sem significância estatística. As amostras de carpas e tilápias apresentaram maiores taxas de lesões das classes 1, 2 e 3, porém sem diferença estatística em relação ao controle. Não foram observadas lesões de classe 4 em nenhum dos grupos.

Em condições laboratoriais controladas, utilizando carpas como modelo experimental, Mustava et al. (2012) demonstraram que lesões de grau 2 e 3 podem ser causadas por condições como hipóxia ou presença de metais pesados. A contaminação ambiental tende a reduzir a disponibilidade de oxigênio e, associada à presença de outros poluentes, especialmente metais pesados, intensifica o estresse oxidativo e a formação de danos ao material genético.

Uma característica relevante observada durante a coleta das amostras foi a proximidade entre os estabelecimentos rurais e os tanques de criação de peixes, fator que, associado ao relevo acidentado da região, aumenta o risco de contaminação dos ambientes aquáticos e, conseqüentemente, dos peixes.

A partir das classes de dano, foram calculados os escores do ensaio cometa para as espécies estudadas e para o controle negativo. Observou-se que as carpas apresentaram escores significativamente maiores ($p < 0,05$), com média de $54,4 (\pm 35,5)$, quando comparadas ao controle negativo ($32,77 \pm 7,1$). Nas tilápias, os escores foram maiores ($49,9 \pm 29,8$), porém sem diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p = 0,132$). Não houve diferença significativa entre os escores de carpas e tilápias ($p = 0,23$).

Utilizando o ensaio cometa para monitoramento ambiental, Grisolia et al. (2009) investigaram danos ao material genético de sete espécies de peixes no Lago Paranoá, em Brasília. Os escores de dano ao DNA encontrados foram $38,25 (\pm 3,44)$ para carpas e $37,32 (\pm 43,63)$ para tilápias, sendo essas as espécies com menores níveis de dano, sugerindo maior tolerância ao estresse ambiental. Em comparação, os escores obtidos no presente estudo foram mais elevados para ambas as espécies, com maiores taxas de dano observadas em carpas.

Foram observadas médias de $15,43 (0,78\%)$ e $12,8 (0,69\%)$ micronúcleos por 2.000 células em carpas e tilápias, respectivamente, sem diferença estatística entre as espécies ($p = 0,882$).

Os micronúcleos são formados por cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não são incorporados ao núcleo principal durante a divisão celular, em decorrência de danos genéticos ou defeitos na citocinese. O teste do micronúcleo fornece uma medida do potencial aneugênico e clastogênico de agentes ambientais (Heddle et al., 1991). Embora os mecanismos responsáveis pelas alterações morfológicas nucleares não sejam totalmente elucidados, tais anormalidades são consideradas indicativas de genotoxicidade (Cavas e Ergene-Gozukara, 2005). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre as espécies avaliadas, os resultados

corroboram os dados obtidos no ensaio cometa, que indicaram maiores taxas de lesão em carpas.

Embora a impossibilidade de conduzir o estudo em condições laboratoriais controladas represente uma das principais limitações deste trabalho, as lesões identificadas podem estar associadas ao uso intensivo de pesticidas e ao descarte de resíduos provenientes da atividade agroindustrial. Esses poluentes podem induzir alterações genéticas (Bouhafs et al., 2009), resultando em mortalidade e danos cumulativos a curto e longo prazo nas populações exposta

3 CONCLUSÃO

oram identificados, por meio do teste do micronúcleo e do ensaio cometa, danos ao DNA em peixes das espécies tilápia e carpa cultivados em tanques localizados próximos às lavouras em estabelecimentos rurais do município de São Miguel do Oeste.

Esses resultados sugerem a presença de substâncias genotóxicas nesses ambientes.

Aparentemente, as carpas mostraram-se mais sensíveis como biomarcadores de lesões genotóxicas quando comparadas às tilápias.

Há necessidade de estudos mais abrangentes, utilizando condições laboratoriais controladas e análises da qualidade da água para a identificação dessas substâncias, bem como da adoção de medidas educativas e de controle voltadas à redução da poluição ambiental.

REFERÊNCIAS

AKAISHI, F. M.; DE ASSIS, H. S.; 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. O. 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, n. 2, p. 244–253, 2004.

BARŠIENĖ, J.; ANDREIKĖNAITĖ, L.; GARNAGA, G.; RYBAKOVAS, A. Genotoxic and cytotoxic effects in bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. *Ekologija*, v. 54, n. 1, p. 44–50, 2008.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, v. 44, p. 383-392, 2001.

BOUHAFS, N.; BERREBBAH, H.; DEVAUX, A.; ROUABHI, R.; DJEBAR, M. R. Micronucleus induction in erythrocytes of tadpole *Rana saharica* (green frog of North Africa) exposed to Artea 330EC. *Am. Eur. J. Toxicol. Sci*, v. 1, p. 7–12, 2009.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 19, n. 1, p. 107–111, 2005

ÇAVAŞ, T.; KÖNEN, 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.

DE ANDRADE, V. M.; DA SILVA, J.; DA SILVA, F. R.; HEUSER, V. D.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L.; DE FREITAS, T. R. O. Fish as Bioindicators to Assess the Effects of Pollution in Two Southern Brazilian Rivers Using the Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 44, n. 5, p. 459–468, 2004.

DE LEMOS, C. T.; RÖDEL, P. M.; TERRA, N. R.; ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, n. 6, p. 1320–1324, 2001.

EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2013-2014, p. 211, 2015.

FRENZILLI, G; NIGRO, M; LYONS, B. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 681, n. 1, p. 80–92, jan. 2009.

GOKSOYR, T. S.; SOLBERG, T. S.; SEERIGSTAD, B. Immunochemical Detection of Cytochrome P450IA1 Induction in Cod Larvae and Juveniles Exposed to a Water Soluble Fraction of North Sea Crude Oil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 22, n. 3, p. 122-127, 1991.

DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and molecular biology*, v. 32, n. 1, p. 138–143, 2009.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; OTHERS. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v. 18, n. 1, p. 45–51, 2003.

HEDDLE, M. C.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 18, p. 277–291, 1991.

HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C.; WINDEBANK, S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, v. 13, n. 1, p. 89–94, 1998.

Sobre o(s) autor(es)

Bárbara Lidiane Kummer Mallmann, Acadêmica do curso de Farmácia da Unoesc, campus de São Miguel do Oeste -SC, email: barbaralkm16@gmail.com

Carina Zuppa, Doutorado em Gerontologia Biomédica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, Docente da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste, email: carina_zuppa@unoesc.edu.br

Tiago Mateus Andrade Vidigal, Mestrado em Biotecnologia aplicada à Agricultura pela Universidade Paranaense. Docente da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste, email: tiago.vidigal@unoesc.edu.br