

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

JOÃO FELIPE MOREIRA NETO

BIOMONITORAMENTO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DE INSETICIDAS COM
POECILIA VIVIPARA

UBERLÂNDIA
2010

JOÃO FELIPE MOREIRA NETO

**BIOMONITORAMENTO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DE INSETICIDAS COM
*POECILIA VIVIPARA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia (MG) para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

UBERLÂNDIA

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M813b Moreira Neto, João Felipe, 1983
2010 Biomonitoramento dos efeitos genotóxicos de inseticidas com
Poecilia vivipara [recurso eletrônico] / João Felipe Moreira Neto. - 2010.

Orientador: Malcon Antonio Manfredi Brandeburgo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.850>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Dengue - Controle. 3. Inseticidas. 4. Poecilia vivipara. I. Brandeburgo, Malcon Antonio Manfredi, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

JOÃO FELIPE MOREIRA NETO

**BIOMONITORAMENTO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DE INSETICIDAS COM
*POECILIA VIVIPARA***

Relatório final, apresentado a Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Local, 28 de Julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo
Universidade Federal de Uberlândia
<http://lattes.cnpq.br/1971957451956843>

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno
Universidade Federal de Uberlândia
<http://lattes.cnpq.br/8749432300669522>

Prof. Dra. Zaira da Rosa Guterres
Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul
<http://lattes.cnpq.br/6105425657565126>

Dedico este trabalho à minha família!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus e a todos os meus familiares, em especial à minha mãe Maria Zilda e meus irmãos Mário Júnior e Franciene Aparecida. Agradecer também ao Prof. Dr. Malcon A. M. Brandeburgo, meu orientador, pela confiança e apoio. Agradecer aos demais professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pela solicitude e solidariedade.

Com vocês, divido a alegria desta experiência.

A persistência é o menor caminho para o êxito.

Charles Chaplin

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Espécie <i>Poecilia vivipara</i> , popularmente conhecida como Lebiste ou Guppy.	12
Figura 2: Micronúcleo em células de eritrócitos de sangue periférico de <i>Poecilia vivipara</i> , corados com Giemsa a 10%.	14
Figura 3: Classificação dos cometas de acordo com níveis de danos no DNA.	15
Tabela 1: Mediana das frequências de micronúcleos observadas no Controle Negativo.	15
Tabela 2: Mediana das frequências de micronúcleos observadas no Controle Positivo.	16
Tabela 3: Mediana das frequências de micronúcleos do tratamento com Cipermetrina.	16
Figura 4: Medianas dos micronúcleos encontrados no tratamento com Cipermetrina, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.	17
Tabela 4: Mediana das frequências de micronúcleos no tratamento com Temefós.	17
Figura 5: Medianas dos micronúcleos encontrados nos tratamentos com Temefós, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.	18
Tabela 5: Mediana dos escores encontrados no Controle Negativo do Teste do Cometa.	18
Tabela 6: Mediana dos escores encontrados no Controle Positivo do Teste do Cometa.	19
Tabela 7: Mediana dos escores encontrados no tratamento com Cipermetrina.	19
Figura 6: Medianas dos escores encontrados nos tratamentos com Cipermetrina, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.	20
Tabela 8: Mediana dos escores encontrados nos tempos do tratamento com Temefós.	20
Figura 7: Medianas dos escores encontrados nos tratamentos com Temefós, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.	21

Lista de Abreviaturas

mg – Miligrama

mL – Mililitro

μL – Microlitro

M – Molar

mM – Milimolar

min – Minutos

pH – Potencial Hidrogeniônico

Tris – Tris Hidroximetilaminometano

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

mA – Miliamperes

V – Volts

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

L – Litro

Hrs – Horas

°C – Graus Celsius

RESUMO

As estratégias de controle do principal vetor da dengue, *Aedes aegypti*, estão baseadas na utilização de produtos químicos e biológicos integrados com programas de manejo ambiental. Os programas públicos que visam controlar o mosquito baseiam-se no uso de inseticidas industrializados, dos quais se destacam o organofosforado Temefós e o piretróide Cipermetrina. Ao atingir os ambientes aquáticos, os inseticidas afetam os organismos alvo e não-alvo, alterando a estrutura dos ecossistemas, matando, inclusive, os predadores naturais das larvas de *A. aegypti*. O desenvolvimento de Biomarcadores baseados em respostas biológicas de organismos tratados com poluentes vem sendo amplamente utilizados para monitorar os efeitos da exposição a contaminantes. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito genotóxico na espécie de peixe *Poecilia vivipara* exposta aos inseticidas Cipermetrina e Temefós. Para tanto, foram utilizados o Teste do Micronúcleo e o Teste do Cometa em eritrócitos. Os animais ficaram expostos durante 96 horas, ocorrendo coletas a cada 24 horas para análise da frequência de micronúcleos e dos escores dos índices de danos no DNA. O Teste do Micronúcleo revelou diferenças significativas quando se comparou a frequência de micronúcleos do controle negativo com as frequências do tratamento com Cipermetrina (ANOVA, $P=0,00039$) e do tratamento com Temefós (ANOVA, $P<0,0001$). O Teste do Cometa também apresentou diferenças significativas na comparação entre os escores do controle negativo com os escores do tratamento com Cipermetrina (ANOVA, $P<0,0001$) e os escores do tratamento com Temefós (ANOVA, $P<0,0001$). Os inseticidas Cipermetrina e Temefós, amplamente utilizados no controle de *Aedes aegypti*, apresentaram ação genotóxica no peixe *Poecilia vivipara*, predador das larvas do mosquito.

Palavras-chave: *Poecilia vivipara*, Cipermetrina, Temefós, Teste do Micronúcleo, Teste do Cometa, Biomonitoramento.

ABSTRACT

The strategies to control the major dengue transmitter, *Aedes aegypti*, are based in the utilization of chemical and biological products together with environmental management programs. The public programs that try to control the mosquito are based in the use of industrialized insecticides, which emphasize the organophosphate Temephos and the pyrethroid Cypermethrin. When into the aquatic habitats, the insecticides affect the target and non-target organisms, modifying the ecosystems structure, killing, all together, the *A. aegypti* larvae natural predators. The development of biomarkers based on biological answers from pollutants treated organisms are being used to monitor the effects of the exposition to contaminants. This study's goal was to evaluate the genotoxic in the fish specie *Poecilia vivipara* which was exposed to the insecticides Cypermethrin and Temephos. For this, were used the Micronuclei Assay and the Comet Assay in erythrocytes. The animals were exposed for a period of 96 hours, with collects being done every 24 hours for the micronuclei frequency analyze and the scores of the indices of DNA damages. The Micronuclei Assay revealed significant differences when compared the negative control micronuclei frequencies treatment with the Cypermethrin (ANOVA, $P= 0,00039$) and the Temephos (ANOVA, $P<0,0001$) treatments. The Comet Assay also presented significant differences when compared the scores from the negative control, and the scores from the Cypermethrin (ANOVA, $P<0,0001$) and Temephos (ANOVA, $P<0,0001$) treatments. The insecticides Cypermethrin and Temephos, amply used on the control of *Aedes aegypti*, presented genotoxic action in the *Poecilia vivipara* fish, the mosquito larvae predator.

Key-Words: *Poecilia vivipara*, Cypermethrin, Temephos, Micronuclei Assay, Comet Assay, Biomonitoring.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Biomonitoramento Ambiental	7
2.2 Efeitos De Poluentes Sobre Organismos Aquáticos	7
2.3 Peixes Como Modelo Animal.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Material biológico.....	10
3.2 Químicos.....	10
3.3 Exposição dose-tempo	10
3.4 Teste do Micronúcleo	11
3.6 Análise estatística	12
4 RESULTADOS	13
4.1 Frequência de micronúcleos	13
4.1.1 Controle Negativo	13
4.1.2 Controle Positivo.....	13
4.1.3 Expostos a Cipermetrina	13
4.1.4 Exposição ao Temefós	14
4.2 Teste do Cometa	15
4.2.1 Controle Negativo	15
4.2.2 Controle Positivo.....	15
4.2.3 Expostos a Cipermetrina	16
4.2.4 Exposição ao Temefós	17
5 DISCUSSÃO	18
5.1 Teste do micronúcleo.....	18
5.2 Teste do cometa	19
6 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

As estratégias de controle do principal vetor da dengue, *Aedes aegypti*, estão baseadas na utilização de produtos químicos e biológicos integrados com programas de manejo ambiental. Os programas públicos que visam controlar o mosquito baseiam-se no uso de inseticidas industrializados, dos quais se destacam os organofosforados e piretróides. O organofosforado Temefós e o piretróide Cipermetrina, utilizados no controle de larvas e adultos de *Aedes*, respectivamente, têm sido empregados continuamente (Kerr, et al. 2009).

Os principais efeitos causados pelos organofosforados estão relacionados, primeiramente, à inibição da acetilcolinesterase, uma importante enzima do sistema nervoso que, quando inibida, provoca acúmulo de acetilcolina nas sinapses com consequente colapso do sistema nervoso, resultando na morte do organismo contaminado (Fulton & Key 2001). Os efeitos secundários, porém muito relevantes, são resultantes da genotoxicidade dos organofosforados. O efeito genotóxico é causado por lesões no DNA, incluindo quebras, bases modificadas e eventos de perdas de cromossomos, durante a divisão celular (Kirsch-Volders et al. 2003).

Os piretróides são compostos que atuam como neurotóxicos, causando hiperestimulação do sistema nervoso devido ao bloqueio que exerce nos canais de sódio (Narahashi, 1996).

Ao atingir os ambientes aquáticos, os inseticidas afetam os organismos alvo e não-alvo, alterando a estrutura dos ecossistemas, matando, inclusive, os predadores naturais das larvas de *A. aegypti* (Titenko-Holand et al., 1997; Das & John, 1999; Çakir & Sarikaya, 2005; Piña-Guzmán et al., 2006). O uso frequente de inseticidas pode levar ao desenvolvimento de resistência do mosquito ao inseticida (Karunaratne & Hemingway, 2001), favorecendo o aumento das populações de *A. aegypti*, dos índices de casos de dengue (Marcoris et al., 1999; Campos & Andrade, 2001) e desestabilizando os ecossistemas que atingem.

Os efeitos dos inseticidas em animais não-alvos vão desde alterações fisiológicas, relativamente simples, até a morte do organismo. Entretanto, a exposição a concentrações subletais dessas substâncias pode induzir mudanças em níveis individuais, mas que implicarão em alterações nos parâmetros populacionais. A energia empregada na detoxificação e o estresse causado pelas doses subletais causam mudanças no metabolismo do organismo, alterando a sobrevivência e reduzindo a reprodutividade das populações afetadas (Duquesne, 2006).

O desenvolvimento de Biomarcadores baseados em respostas biológicas de organismos tratados com poluentes vem sendo amplamente utilizados para monitorar os efeitos da exposição a contaminantes. Estudos que envolvem marcadores para contaminação individual, populacional e do ambiente são relevantes por fornecer parâmetros que possibilitam avaliar e prever os efeitos da propagação de inseticidas em sistemas biológicos, mostrando os possíveis impactos em diversas populações, alcançando uma ampla visão do impacto ambiental causado pelo uso exacerbado de inseticidas (Duquesne, 2006).

Peixes do gênero *Poecilia* geralmente são onívoros, comendo invertebrados aquáticos e terrestres, detritos e plantas, larvas de insetos, sendo bastante utilizados como controladores biológicos do mosquito *Aedes aegypti*. A maioria dos estudos sobre a dieta de *P. vivipara*, revelou matéria orgânica vegetal como um componente importante de sua dieta (Bizerril & Primo, 2001). A espécie *Poecilia vivipara* tem ampla distribuição ao longo da América do Sul, habitando águas de fluxo lento de clima temperado para regiões tropicais, e apresentam uma alta tolerância a variações térmicas e de salinidade (Trexler, 1989). Eles são considerados organismos-modelo em estudos de biologia reprodutiva e comportamento (Parenti & Rauchenberger, 1989).

Biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas aos poluentes ambientais, podendo ser mensurados, indicando a presença, os efeitos e até mesmo o grau de contaminação. Podem determinar se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos, justificando investigações adicionais para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por isto consideram-se biomarcadores como indicadores precoces de contaminação (Klemz, 2002).

Nas décadas de 50 e 60 a ecologia e a genética se uniram para desenvolver os primeiros testes empregados em genotoxicidade (Villela et al., 2003).

Os micronúcleos são massas de cromatina formadas por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros perdidos durante a anáfase na divisão celular, devido a eventos clastogênicos ou aneugênicos. Eles também podem ser provenientes da interação de agentes químicos, físicos e biológicos com estruturas não genômicas, que promovem distúrbios na maquinaria mitótica e falha na segregação dos cromossomos (Schmid, 1975; Rabello-Gay, 1991; Al-Sabti, 1995; Fenech, 2000; Souza & Fontanelli, 2006).

O teste do micronúcleo é uma técnica vantajosa, podendo ser usada em qualquer tipo de população celular em proliferação, não sendo necessário o conhecimento prévio do cariótipo do animal (Rodriguez-Cea et al., 2003).

A técnica desenvolvida por Schmid (1975) foi adaptada de roedores para a aplicação laboratorial em peixes por Hooftman & Raat (1982). Muitos estudos utilizam o teste do micronúcleo para detectar os efeitos da exposição de substâncias químicas, mutagênicas e cancerígenas em peixes (Manna & Sadhukhan, 1986; Majone et al., 1988; Campana et al., 1999; Grisolia & Starling, 2001). O teste é considerado um dos métodos mais úteis para a avaliação da genotoxicidade nos ecossistemas aquáticos (Heddle et al., 1991).

Algumas anomalias nucleares são registradas em peixes após serem expostos a substâncias químicas ou poluentes da água, por isso alguns autores sugerem que essas anomalias sejam levadas em consideração durante a análise convencional de micronúcleos, pois podem estar relacionadas aos processos de citotoxicidade, ações sobre a divisão celular e a genotoxicidade ou mutagenicidade (Souza & Fontanelli, 2006).

O Ensaio do Cometa é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas (Ferraro, 2004), através da medição da migração do DNA em gel depois de uma corrida eletroforética (Singh et al., 1988). Os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica formam uma longa cauda, por isso o nome cometa (Bombail et al., 2001).

Pela sua sensibilidade em quantificar lesões no DNA em células individuais, esta técnica é excelente para o biomonitoramento ambiental, detectando os efeitos de poluentes genotóxicos em águas superficiais e sedimentos (Pandurangi et al., 1995; Mitchelmore & Chipman, 1998).

Para a avaliação da extensão do dano causado ao DNA, uma das medidas utilizadas é a relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelo DNA em migração (classificados como classe 0 - nenhum dano, até a classe 4 - possivelmente em apoptose). Esta análise pode ser feita visualmente ou através de softwares especiais.

O Sulfato de Cobre, utilizado nesse trabalho como Controle Positivo, é altamente tóxico em peixes, sendo muitas vezes utilizado como peixecida. Ele provoca aumento da respiração mitocondrial, diminui as respostas a estimulações adrenérgicas, acidificação intracelular e o mais importante, reduz a viabilidade celular (Manzl et al., 2004). Os efeitos do sulfato de cobre têm sido bastante estudados, e sabe-se que algumas espécies são mais susceptíveis que outras (Carvalho & Fernandes, 2005).

Muitas pesquisas com estudos *in vitro* e com culturas de células afirmam a capacidade do cobre de iniciar danos oxidativos além de peroxidação de membranas lipídicas, interferindo em importantes eventos celulares (Krumshnabel et al., 2005; Gaetke & Chow, 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito genotóxico na espécie de peixe *Poecilia vivipara* exposta aos inseticidas Cipermetrina e Temefós. Para tanto, foram utilizados o Teste do Micronúcleo e o Teste do Cometa em eritrócitos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomonitoramento Ambiental

Nas últimas décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle aos agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas. (Da Silva et al., 2003).

As principais situações que requerem biomonitoramento ambiental são aquelas onde se acredita que espécies nativas estão sendo ameaçadas, quando há implicações para a saúde humana no consumo de organismos afetados ou quando se quer conhecer a qualidade ambiental (Da Silva *et al.*, 2003).

Muitas substâncias tóxicas podem ser transferidas dos tecidos dos organismos para os seus predadores e chegar a concentrações de maiores magnitudes nos níveis tróficos superiores (De Lemos & Terra, 2003).

O biomonitoramento utilizando organismos expostos a poluentes e testes em sistemas biológicos são ferramentas para a identificação de substâncias capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (Da Silva *et al.*, 2003).

2.2 Efeitos De Poluentes Sobre Organismos Aquáticos

O aumento de contaminantes antropogênicos e outros estressores tem provocado mudanças bruscas nos ecossistemas aquáticos, despertando interesse em questões como a acumulação e os efeitos tóxicos de contaminantes na sobrevivência de organismos aquáticos (Malins & Ostrander, 1991).

Estudos dos efeitos causados por substâncias químicas sobre organismos aquáticos utilizam desde espécies do fitoplâncton até grandes mamíferos, como as baleias (Malins & Ostrander, 1991). A toxicologia aquática inicialmente focava principalmente o estudo com substâncias químicas tóxicas ao meio ambiente, entretanto, ocorreu a expansão destes estudos e atualmente envolvem conversões metabólicas de carcinógenos, modificações no DNA e outros processos bioquímicos distintos. Alguns sistemas bioquímicos dos organismos aquáticos são similares ao de animais terrestres, tal como o sistema que responde a substância estranha ao organismo e aquele responsável pelas oxidases de funções mistas (Malins & Ostrander, 1991).

A contaminação dos recursos hídricos ocorre pela ação direta, ou seja, por meio de substâncias que são lançadas diretamente no ambiente, por exemplo, esgotos urbanos e efluentes industriais. De modo indireto por meio de substâncias lançadas no solo ou no ar que em função das chuvas ou infiltração podem atingir as águas. Nem todo composto orgânico presente na água pode ser qualificado, dificultando a determinação de seus efeitos biológicos e sua contaminação total, tornando-se necessário o desenvolvimento de novos testes biológicos para determinar a contaminação total e as vias mais sensíveis à contaminação (Deventer, 1996; Grisolia, 2005).

Estudos sobre a exposição de espécies aquáticas aos compostos genotóxicos, os quais aumentam o risco de câncer, toxicidade de embriões e efeitos teratogênicos são importantes para determinar o potencial do impacto ecológico de cada efeito nos indivíduos. Esse impacto pode levar a distúrbios na dinâmica da população e na comunidade. Dentre as implicações ecológicas associadas a genotoxicidade, a detecção e quantificação dos danos genéticos são mais interessantes para a realização de estudos ambientais (Nacci *et al.*, 1996).

Agentes genotóxicos causam danos no DNA e caso eles não sejam reparados, pode ser iniciada uma série de consequências biológicas nas células, órgãos, no animal inteiro, atingindo assim a população e comunidade do organismo. Estes danos, em uma variedade de animais aquáticos, estão associados à redução do crescimento corporal, desenvolvimento anormal, diminuição da sobrevivência de embriões, larvas e animais adultos (Lee & Steinert, 2003). Os agentes genotóxicos podem produzir quebras nas fitas do DNA, modificação de bases, em sítios sensíveis a alcalinidade, alterações nos locais de ligação entre o DNA-DNA e entre o DNA-proteínas (Lee & Steinert, 2003).

A poluição das águas por compostos genotóxicos tem sido determinada principalmente pela execução de ensaios como o teste de AMES e SMART em amostras de água ou extratos; os peixes e os moluscos também são utilizados como organismos teste (Deventer, 1996). Uma variedade de métodos foi desenvolvida para detectar os danos no DNA, entre eles o teste de micronúcleos, o de aberrações cromossômicas (Deventer, 1996), o de troca de cromátides irmãs (Lee & Steinert, 2003), os quais necessitam da proliferação celular. Entretanto, existem técnicas como a desenvolvida por Singh *et al.* (1988), o teste de eletroforese em células isoladas, que detecta quebras simples no DNA, áreas sensíveis à alcalinidade e pode avaliar células em proliferação e não proliferativas (Monteith & Vanstone, 1995; Lee & Steinert, 2003).

2.3 Peixes Como Modelo Animal

O uso de peixes como modelo animal em testes laboratoriais está aumentando devido a sua biodiversidade e ampla variedade de habitats (Powers, 1989), pela existência de técnicas padronizadas para as culturas em laboratório e a grande quantidade de informações biológicas e toxicológicas (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Miracle & Ankley, 2005). Os peixes também podem acumular substâncias químicas pela exposição direta aos poluentes presentes na água ou indiretamente pela cadeia alimentar (Ateeq et al., 2002).

Os peixes indicam o potencial de exposição de populações humanas a genotóxicos químicos, sendo considerados os maiores vetores de transferência de contaminantes para humanos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Os peixes da espécie *Poecilia vivipara*, conhecidos popularmente como Lebiste ou Guppy (Figura 1), utilizados neste trabalho foram coletados no reservatório artificial na Universidade Federal de Uberlândia, sendo selecionadas apenas fêmeas entre 4,5 e 5 centímetros de tamanho. Após a seleção os peixes foram divididos em oito grupos de vinte animais e cada grupo foi colocado em aquário com cinquenta litros de água de-clorada, sendo alimentados com ração para peixes três vezes ao dia. Eles foram mantidos sob aeração constante, temperatura de 25 ± 2 °C e pH 7,4 . Para aclimatização, os peixes foram mantidos nos aquários por sete dias antes do tratamento.



Figura 1: Espécie *Poecilia vivipara*, popularmente conhecida como Lebiste ou Guppy.

3.2 Químicos

Amostras do inseticida organofosforado Temefós (Abate[®]) CAS number: 3383-96-8 lote: 091126-017 fabricação: 26/11/2009 Itaim Bibi/SP e do piretróide Cipermetrina (Cynoff[®]) CAS number: 52315-07-8 lote: 080417-121 fabricação: 17/04/2008 Uberaba /MG foram doadas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia.

3.3 Exposição dose-tempo

Após aclimatização os peixes dos aquários 1 e 2 foram submetidos a concentração de 0.02 mg/L de Cipermetrina, os dos aquários 3 e 4 a concentração de 0.02 mg/L de Temefós, dosagens recomendadas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia para combate ao *Aedes aegypti*. Os peixes dos aquários 5 e 6 continuaram na água de-clorada (Controle

Negativo) e os animais dos aquários 7 e 8 foram utilizados como Controle Positivo, sendo submetidos a concentração de 0,05 mg/L de Sulfato de Cobre . Os animais ficaram expostos durante 96 horas, ocorrendo coletas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. Para a análise coletou-se quatro animais por aquário a cada 24 horas.

3.4 Teste do Micronúcleo

O sangue dos peixes foi coletado por punção caudal, utilizando seringa heparinizada com capacidade para 1 mL e agulha de parede fina (Udroiu, 2006). Cada amostra foi imediatamente submetida a técnica de esfregaço em lâmina de vidro para microscopia de luz. O esfregaço foi fixado em metanol puro por 15 min, seguido de coloração com giemsa 10% solubilizado em tampão Sorensen (Na_2HPO_4 0,06 M; KH_2PO_4 0,06 M, pH 6,8) por 10 min. Para verificar a frequência de micronúcleos foram analisadas 2.000 células com membrana celular intacta por exemplar, sendo analisadas 16.000 células a cada 24 horas por cada tratamento, totalizando 64.000 analisadas no final de cada tratamento. Foram aceitos como micronúcleos os fragmentos circulares que equivaleram a cerca de 1/3 a 1/20 do núcleo principal e que apresentaram mesma coloração, intensidade e estiveram desconectados deste (Figura 2).



Figura 2. Micronúcleo em células de eritrócitos de sangue periférico de *Poecilia vivipara*, corados com Giemsa a 10%.

3.5 Teste do Cometa

O sangue para o Teste do Cometa foi coletado juntamente com o sangue para o Teste do Micronúcleo. Para cada lâmina, 5 μL de sangue de cada peixe foram solubilizados em 75 μL de agarose *low-melting point* 0,75%. Esta solução foi espalhada sobre uma lâmina de microscopia com pré-cobertura de agarose (0,5%). As lâminas foram, posteriormente, submergidas em Tampão de Lise Alcalina (sarcosinato de sódio 1%, NaCl 2,5 M, EDTA 100

mM, Tris HCl 10 M, pH 10) por uma hora a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal. A eletroforese foi realizada em condições alcalinas (pH 13) a 25V e uma corrente de 300mA por 15 minutos. Finalmente, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5. Após secagem, procedeu-se a coloração com solução de prata (nitrato de prata 0,1%; ácido tungstosilícico 0,25%; formaldeído 0,15%). Foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo utilizado no experimento, perfazendo um total de 800 células por período de cada tratamento, totalizando 3.200 células no final de cada tratamento. As células foram classificadas individualmente em quatro classes de cometa de acordo com o tipo de dano identificado (dano 0 a dano 4) (Figura 3). Para a quantificação do dano no DNA, o escore total para 100 células analisadas variou de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 400 (dano máximo = todas as células com dano de classe 4) (Jaloszynski, 1999), sendo empregada a fórmula:

$$ID (ua) = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

Onde,

ID = índice de danos no DNA;

ua = unidade arbitrária;

N1 –N4 = nucleóides nas classes 1, 2, 3 e 4;

S = número de nucleóides analisados, incluindo os da classe 0.

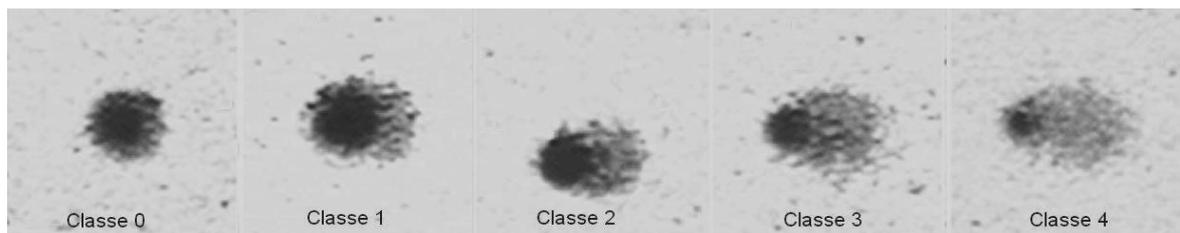


Figura 3: Classificação dos cometas de acordo com níveis de danos no DNA.

3.6 Análise estatística

Todos os dados foram estatisticamente analisados. Sendo considerados estatisticamente significantes valores de P inferiores a 0,05 (Callegari-Jacques, 2006).

4 RESULTADOS

4.1 Frequência de micronúcleos

4.1.1 Controle Negativo

A comparação dos micronúcleos observados após 24, 48, 72 e 96 horas do controle negativo não revelou diferença significativa (ANOVA, $P=0,964$). A tabela 1 mostra a mediana dos micronúcleos obtidos no Controle Negativo.

Tabela 1: Mediana das frequências de micronúcleos observados no Controle Negativo.

Tempo	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
Mediana da frequência	1,375	1,25	1,5	1,375

4.1.2 Controle Positivo

A tabela 2 mostra a mediana dos micronúcleos encontrados por indivíduo no Controle Positivo. A comparação da frequência dos micronúcleos encontrados em diferentes períodos do tratamento com Sulfato de Cobre não revelou nenhuma diferença significativa entre eles (ANOVA, $P=0,177$). Mas a comparação entre os micronúcleos encontrados nos controles Positivo e Negativo indicou uma diferença significativa (ANOVA, $P<0,0001$).

Tabela 2: Mediana das frequências de micronúcleos observadas no Controle Positivo.

Tempo	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
Mediana da frequência	7	7,625	8,25	8,5

4.1.3 Expostos a Cipermetrina

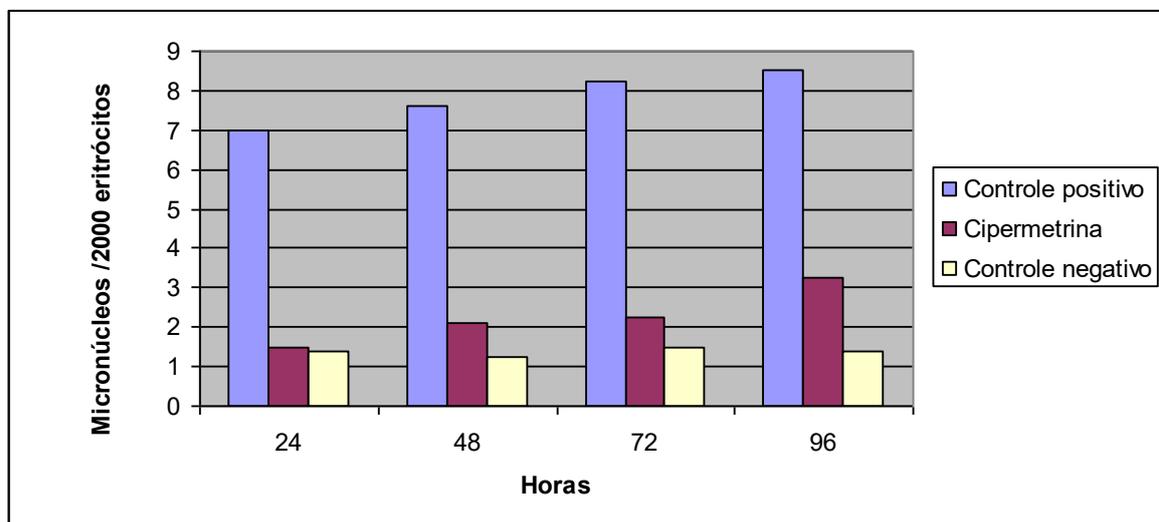
A tabela 3 mostra a mediana, crescente de acordo com o tempo de exposição, dos micronúcleos encontrados por indivíduo nos tempos do tratamento com Cipermetrina. Na comparação dos micronúcleos encontrados nos tempos do tratamento com Cipermetrina uma diferença significativa foi observada entre eles (ANOVA, $P=0,0029$). Na comparação entre os micronúcleos encontrados nos tratados com Cipermetrina e Controle Negativo foi observada uma diferença significativa (ANOVA, $P=0,00039$), assim como na comparação entre os micronúcleos encontrados no tratado com Cipermetrina e Controle Positivo (ANOVA,

$P < 0,0001$). A figura 1 mostra a mediana dos micronúcleos encontrados no tratamento com Cipermetrina frente os controles Positivo e Negativo.

Tabela 3: Mediana das frequências de micronúcleos do tratamento com Cipermetrina.

Tempo	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
Mediana da frequência	1,5	2,125	2,25	3,25

Figura 4: Medianas dos micronúcleos encontrados no tratamento com Cipermetrina, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.



4.1.4 Exposição ao Temefós

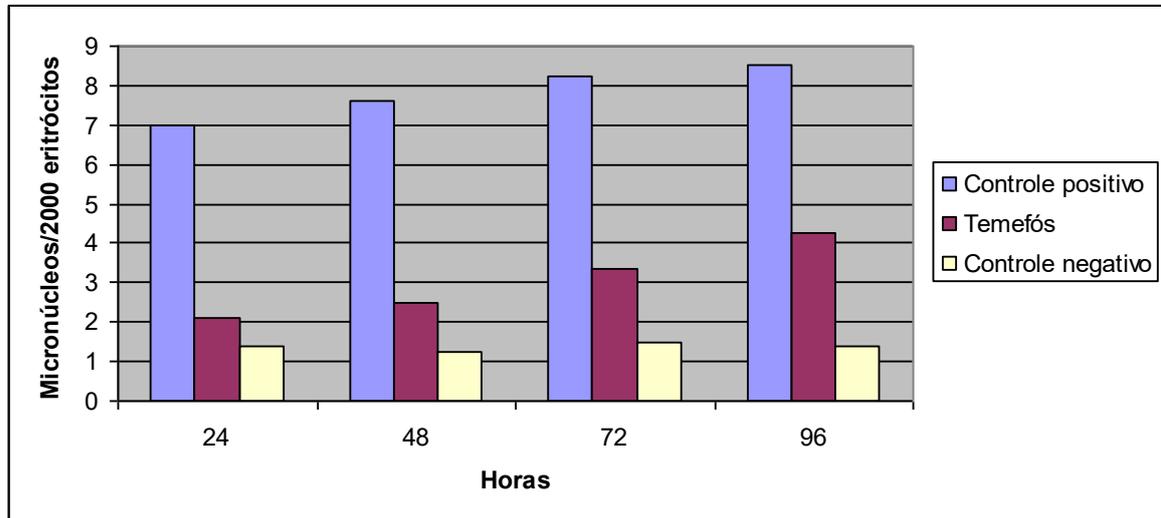
Para os peixes expostos ao Temefós também se observou um aumento gradativo nas médias das frequências de micronúcleos de acordo com os tempos de exposição (Tabela 4). Comparando as frequências entre os tempos de exposição se observou diferenças significativas (ANOVA, $P = 0,00067$). Na comparação dos animais expostos ao Temefós com os controles Negativo e Positivo, ambas as diferenças foram (ANOVA, $P < 0,0001$). A figura 2 mostra as médias de micronúcleos encontradas nos animais expostos ao Temefós, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.

Tabela 4: Mediana das frequências de micronúcleos no tratamento com Temefós.

Tempo	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
-------	-------	-------	-------	-------

Mediana da frequência 2,125 2,5 3,375 4,25

Figura 5: Medianas dos micronúcleos encontrados nos tratamentos com Temefós, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.



4.2 Teste do Cometa

4.2.1 Controle Negativo

A tabela 5 mostra a mediana dos escores encontrados no Controle negativo, não tendo sido observadas diferenças significativas (ANOVA, $P=0,470$).

Tabela 5: Mediana dos escores encontrados no Controle Negativo do Teste do Cometa.

Tempo	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
Mediana dos escores	47,125	50,5	48,375	47,125

4.2.2 Controle Positivo

As medianas dos escores dos animais tratados com Sulfato de Cobre apresentaram taxas crescentes de danos com maior tempo de exposição (Tabela 6). Diferenças significativas foram observadas na comparação entre os escores dos tempos de exposição dos controles Positivo e Negativo (ANOVA, $P<0,0001$). Na comparação entre os tempos do tratamento com Sulfato de Cobre também foram observadas diferenças significativas entre eles (ANOVA, $P=0,0065$).

Tabela 6: Mediana dos escores encontrados no Controle Positivo do Teste do Cometa.

Tempo	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
Mediana dos escores	230,5	246,25	248,5	251,125

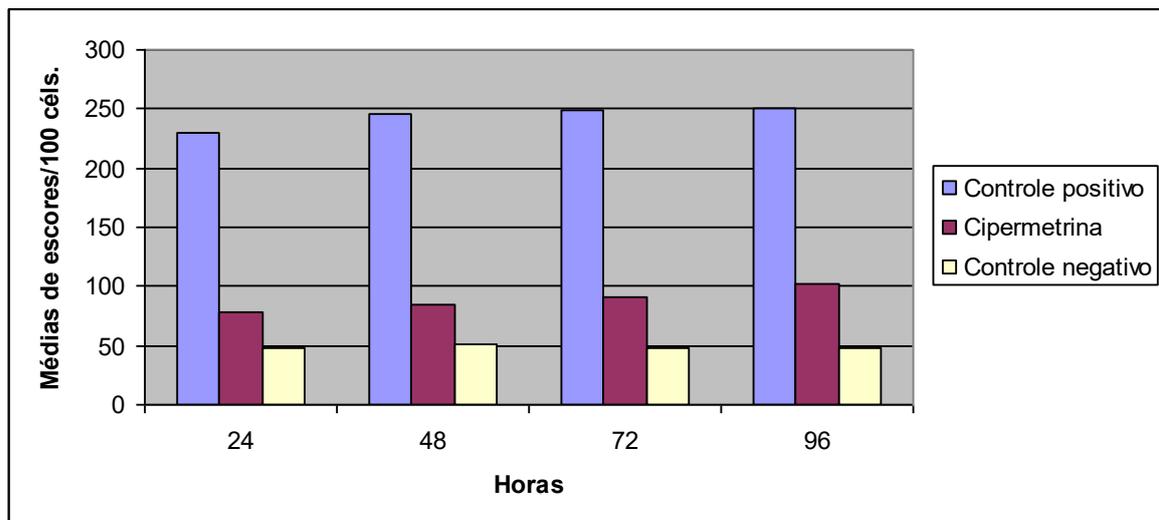
4.2.3 Expostos a Cipermetrina

A mediana dos escores dos animais expostos a Cipermetrina apresentou aumento gradativo de acordo com os tempos de exposição (Tabela 7). Numa comparação entre os escores dos tempos de exposição à Cipermetrina diferenças significativas também foram observadas entre eles (ANOVA, $P < 0,0001$). Quando se comparou os escores dos tratados com Cipermetrina com os escores do Controle Negativo se observou uma diferença significativa (ANOVA, $P < 0,0001$) e com o Controle Positivo (ANOVA, $P < 0,0001$). A figura 3 mostra as médias de escores encontradas na exposição à Cipermetrina, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.

Tabela 7: Mediana dos escores encontrados no tratamento com Cipermetrina.

Tempo	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
Mediana dos escores	78,375	84,25	91,25	102

Figura 6: Medianas dos escores encontrados nos tratamentos com Cipermetrina, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.



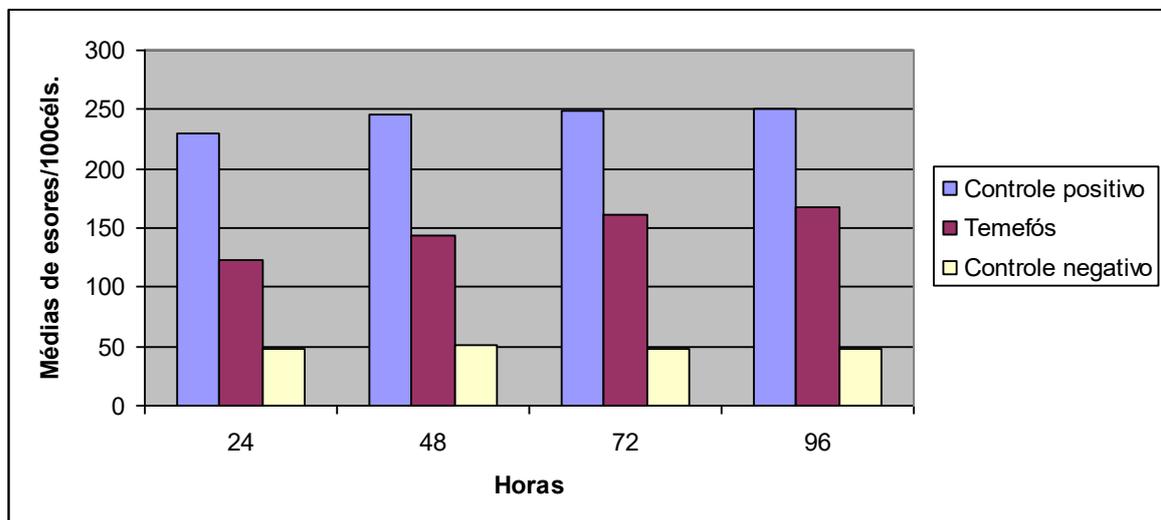
4.2.4 Exposição ao Temefós

Para os peixes expostos ao Temefós também se observou um aumento gradativo nas médias dos escores de acordo com os tempos de exposição (Tabela 8). Numa comparação entre os escores dos tempos de exposição ao Temefós, uma diferença significativa foi observada (ANOVA, $P=0,0001$). Na comparação entre escores dos expostos ao Temefós com os controles Negativo e Positivo, também foram observadas diferenças significativas nas duas ocasiões (ANOVA, $P<0,0001$). A figura 4 mostra as médias de escores encontradas nos animais expostos ao Temefós, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.

Tabela 8: Mediana dos escores encontrados nos tempos do tratamento com Temefós.

Tempo	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
Mediana dos escores	123,25	143,375	161	167,75

Figura 7: Medianas dos escores encontrados nos tratamentos com Temefós, Sulfato de Cobre (Controle Positivo) e Controle Negativo.



5 DISCUSSÃO

Há uma tendência recente de substituir os inseticidas organofosforados e organoclorados pelos inseticidas piretróides (Casida & Quistad, 1998). Essa substituição se deve ao fato dos piretróides apresentarem baixa toxicidade aos mamíferos (Abernathy & Casida, 1973; Casida et al., 1983) quando comparados aos organofosforados. Entretanto, há diversos relatórios a respeito da sensibilidade de espécies de invertebrados aquáticos e de alguns peixes aos piretróides (Bradbury & Coats 1989, Werner et al. 2002, Denton et al. 2003).

Os praguicidas organofosforados foram sintetizados no final da década de 1930. Os piretróides foram desenvolvidos nos anos 80 com a finalidade de substituir os organofosforados e organoclorados, pois estes possuíam alto poder residual e alta toxicidade para seres humanos e animais (Almeida, 1994). Muitos estudos realizados em mamíferos, pássaros e peixes (WHO, 1993) demonstram que os praguicidas organofosforados apresentam alta toxicidade para organismos.

5.1 Teste do micronúcleo

O Teste do Micronúcleo é utilizado para detectar quebras nos cromossomos durante a anáfase e importante por fornecer informações sobre os efeitos clastogênicos causados por poluentes (Grisolia & Starling 2001). Este fato pode ocorrer de maneira natural caso ocorra falha no sistema de reparação da célula ou pode ocorrer devido à presença de compostos xenobióticos de origem orgânica ou inorgânica, que influenciam no aumento da formação de micronúcleo (Cavalcante et al. 2008).

A avaliação genotóxica por meio do Teste do Micronúcleo nos exemplares de *Poecilia vivipara* apresentou um aumento na frequência em comparação ao grupo Controle Negativo, tanto nos animais tratados com Temefós quanto nos tratados com Cipermetrina, revelando uma ação genotóxica de ambos inseticidas. Na comparação com o Controle Negativo a frequência de micronúcleos, tanto dos expostos a Cipermetrina quanto ao Temefós, foi superior em todos os tempos de exposição do experimento. Resultados parecidos foram observados por (Simoniello et al., 2005). Confirmando Almeida (1994), o inseticida organofosforado provocou uma frequência maior de micronúcleos, indicando sua maior toxicidade quando comparado com o piretróide. Aumento na frequência de micronúcleos também foi verificada por Moron et al., (2006) em *Piaractus mesopotamicus* quando exposto

ao herbicida atrazina. Resultado semelhante foi observado por Ayllon & Garcia-Vazquez (2001) em *Oncorhynchus mykiss* quando expostos a ciclofosfamida, N-etil-N-nitrosuera, acrilamida e colchicina.

5.2 Teste do cometa

De acordo com diretrizes internacionais, o Teste 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 contaminantes (Grazeffe et al. 2008). Este teste oferece vantagens consideráveis sobre os outros métodos citogenéticos, por exemplo, os testes de identificação da presença de aberrações de cromossoma, da troca de cromátides irmãs e até mesmo do Teste do Micronúcleo usados para a detecção de dano ao DNA, visto que no Teste do Cometa as células não precisam estar em fase mitótica ativa (Andrade et al., 2004). A interação de agentes genotóxicos com DNA podem contribuir para um nível do aumento de rupturas das bases nucleicas motivando o aumento de danos no DNA (Simoniello et al. 2009). Consequentemente, se não houver reparo do DNA poderá ocorrer efeitos em cascata resultando em alterações a níveis celulares e fisiológicos.

O Teste do Cometa revelou dano genotóxico em eritrócitos da espécie *Poecilia vivipara* no estudo realizado. Assim como no Teste do Micronúcleo os animais expostos ao inseticida Cipermetrina apresentaram escores mais elevados em todos os tempos de exposição, quando comparados ao grupo Controle Negativo. Nos animais expostos ao Temefós os escores de cada tempo de exposição também diferiram significativamente dos escores dos tempos do Controle Negativo. Quando comparados com o Controle Positivo se observou uma diferença significativa dos dois inseticidas, porém os escores dos expostos ao Temefós se aproximaram mais, revelando maiores danos. Os resultados desse teste corroboram resultados encontrados por (Simoniello et al., 2005; Aiub et al., 2002).

6 CONCLUSÃO

Os dois testes aplicados como biomarcadores dos efeitos genotóxicos em *Poecilia vivipara* revelaram a ação genotóxica dos inseticidas Temefós e Cipermetrina. Os dois inseticidas apresentaram níveis crescentes de danos genotóxicos nos peixes, de acordo com o tempo de exposição. Comparando-os, o organofosforado apresentou maiores danos em ambos os testes, Cometa e Micronúcleo.

Como os dois inseticidas necessitam entrar em contato direto com o organismo alvo para se obter a reação desejada e são amplamente utilizados no controle do mosquito da dengue, seus efeitos atingem diversos organismos não-alvo, inclusive o homem, devido à sua forma de aplicação. Desse modo, estudos mais detalhados sobre a ação desses inseticidas são necessários para avaliar seus efeitos sobre esses organismos não-alvo.

REFERÊNCIAS

- Abernathy, CO; Casida, JE. Pyrethroid insecticides: esterase cleavage in relation to selective toxicity. *Science* 79: 1235-1236. 1973.
<https://doi.org/10.1126/science.179.4079.1235>
- Aiub, CAF; Coelho ECA; Sodr e E; Pinto LFR; Felzenszwalb I. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet Mol Res.* V.1(2):159-166. 2002
- Almeida, SYM. Avalia o de neurotoxicidade em ratos, do praguicida piretr oide fenvalerato em modelos comportamentais de ansiedade. S o Paulo. 57p. (Disserta o de Mestrado. Faculdade de Medicina e Zootecnia, USP). 1994.
- Al-Sabti, K; Metcalfe, CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research.* V. 343 p.121-135. 1995.
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)
- Andrade, VM; Freitas, TRO; 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*, 560: 57-67. 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.006>
- Ateeq, B; Abul Farah, M; Ali, NM; Ahmad, W. Induction of micronuclei & rythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-ichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation research*, vol 518: 135-144. 2002.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00075-X)
- Ayllon, F; Garcia-Vazquez, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.*, n.467, p.177-186, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00033-4)
- Bizerril, CRSF; Primo, PBS. Peixes de  guas Interiores do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FEMAR-SEMADS. 2001.
- 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*, vol. 44: 383-392. 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00300-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00300-3)
- Bradbury SP; Coats JR. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Rev Environ Contam Toxicology* 108: 133-177. 1989.
https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8850-0_4
-  akir, S; Sarikaya, R. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology.* v.43, p.443-450. 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.010>
- Callegari-Jacques, SM. Bioestat stica: Princ pios e Aplica es. Porto Alegre: Artmed, 255p. 2006.

- Campana, MA; Panzeri, AM; Moreno, VJ; Dulout, FN. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research*, 438: 155-161. 1999.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00167-3)
- Campos, J; Andrade, CFS. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista Saúde Pública*, 2001, v.35, p.232-236.
<https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000300003>
- Carvalho, CS; Fernandes, MN. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*. 2005.
- Casida, JE; Gammon, DW; Glickman, AH; Lawrence, LJ. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Pharmacol Toxicology* 23: 413–438. 1983.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.23.040183.002213>
- Casida, JE; Quistad, GB. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomology* 43: 1–16. 1998.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>
- Cavalcante, DGSM; Martinez, CBR; Sofia, SH. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mut. Res.*,v.6, p. 41-46, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.010>
- Da Silva, J; Heuser, V; Andrade, V. Biomonitoramento Ambiental. *Genética Toxicológica* p.167-178. 2003.
- Das, P; John, G. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicology Letters*. v.104, p.11-116. 1999.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00355-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00355-5)
- De Lemos, CT; Terra, NR. Poluição: Causas, efeitos e controle. *Genética Toxicológica* p.119-137. 2003
- Denton DL; Wheelock, CE; Murray, S; Deanovic, LA; Hammock, BD; Hinton, DE. Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae. *Environ Toxicol Chem* 22: 336–341. 2003.
[https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2003\)022<0336:JATOEAE>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2003)022<0336:JATOEAE>2.0.CO;2)
- Deventer, K. Detection of Genotoxic Effects on Cells of Liver and Gills of *B. rerio* by Means of Single Cell Gel Electrophoresis. *Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 911-918. 1996.
<https://doi.org/10.1007/s001289900132>
- Duquesne, S. Effects of an organophosphate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: Implications for population dynamics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v.65, p.145-150. 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.01.008>
- Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, Amsterdam v. 455: 81-95. 2000.

Ferraro, MVM; Fenocchio, AS; Mantovani, MS; Oliveira Ribeiro, C; Cestari, MM. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, v.27 (1), p.103-107, 2004.

<https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000100017>

Fulton MH, Key PB. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology Chemistry* 20: 37-45. 2001.

<https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>

Gaetke, LM; Chow, CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. V.189. p.147-163. 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)

Grazeffe, VS; Tallarico, LF; Pinheiro, AS; Kawano, T; Suzuki, MF; Kayo Okazaki, K; Pereira, CAB; Nakano, E. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mut. Res.*, v.654 p. 58-63, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.05.007>

Grisolia, CK. Agrotóxicos - Mutações, Câncer & Reprodução. Editora UnB, pp 392. 2005.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00168-6)

Grisolia, CK; Satarling, FLRM. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research*, 2001, v.491, p.39-44.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00168-6)

Heddle, JA; Cimino, MC; Hayashi, M; Romagna, MD; Tucker, JD; Vanprais, PH; Macgregor, JT. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 18, p. 277-291, 1991.

<https://doi.org/10.1002/em.2850180414>

Hooftman, RN; Raat, W K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research*, 104: 147-152. 1982.

[https://doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0165-7992(82)90136-1)

Jaloszynski, P; Kujawski, M; Wasowicz, M; Szulc, R; Szyfter, K. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutation Research* 439: 199-206.1999.

Karunaratne, SHPP; Hemingway, J. Malation resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull. World Health Organization*. v.79, p.1060-1064. 2001.

Kerr, WE; Pereira, BB; De Campos Júnior, EO; Luís, DP. Todos contra a dengue. *Em extensão*. v. 8, n. 2, p. 152-157. 2009.

Kirsch-Volders, M; Sofuni, T; Aardemac, M; Albertini, S; Eastmond, D; Fenech, M; Ishidate, M; kirchner, S; Iorge, E; Morita, T; Norppa, H; Surralles, J; Vanhauwaert, A; Wakata, A.

Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. Mutation Research. v. 540 p.153-163. 2003.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.07.005>

Klemz, C. Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus* sp (cascudo). 2002. Dissertação de Mestrado: Departamento de Farmacologia – UFPR.

Krumschnabel, G; Manzl, C; Berger, C; Hofer, B. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. Toxicology and Applied Pharmacology. V.209. p.62-73. 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.03.016>

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/Reviews in Mutation Research, Volume 544, 1: 43-64.2003.

Malins, DC; Ostrander, GK. Perspectives in aquatic toxicology. Rev. Pharmacol. Toxicol. 31: 371-399. 1991.

<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.31.040191.002103>

Majone, F; Beltrame, C; Brunetti, R. Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different staining techniques after treatment with zinc chloride. Mutation Research, 209: 131-134. 1988.

[https://doi.org/10.1016/0165-7992\(88\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0165-7992(88)90029-2)

Manna, GK; Sadhukhan, A. Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT.) Current Science, v. 55 n°10. 1986.

Manzl, C; Enrich, J; Ebner, H; Dallinger, R; Krumschnabel, G. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. Toxicology. V.196. p.57-64. 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.11.001>

Marcoris, MLG; Andrighetti, MT; Glasser, CM; Garberloto, VC; Cirino, VCB. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Revista Saúde Pública. v.33, p.521-522. 1999.

<https://doi.org/10.1590/S0034-89101999000500013>

Mitchelmore CL; Chipman JK. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 399,2, 20:135-147.1998.

Miracle, AL; Ankley, GT. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. Reproductive Toxicology, vol 19:321-326. 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.06.007>

Monteith, DK; Vanstone, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage Mutation Research/Genetic Toxicology, Volume 345, 3-4: 97-103. 1995

Moron, SE; Polez, VL; Artoni, RF; Ribas, JL; Kazuyuki, T. Estudo das alterações na concentração de íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. *Jornal da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia*. v.1, n.1, p.1-4, jan. 2006.

<https://doi.org/10.5132/jbse.2006.01.006>

Nacci, D; Cayula, S; Jackim, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, vol. 35: 197-210. 1996.

[https://doi.org/10.1016/0166-445X\(96\)00016-1](https://doi.org/10.1016/0166-445X(96)00016-1)

Narahashi, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.*, v.79, n.1, p.1-14, 1996.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00234.x>

Pandurangi, R; Petras, M; Ralph, S; Vrzoc, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environment and Molecular Mutagenesis*, 26: 345-346. 1995.

<https://doi.org/10.1002/em.2850260411>

Parenti, LR & Raucherberger, M. Systematic overview of the Poeciliines.

In *The Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes (Poeciliidae)* (Meffe, A. & Snelson, F.F., eds), pp. 3–12. 1989.

Piña-Guzmán, B; Solís-Heredia, MJ; Rojas-García, AE; Urióstegui-Acosta, M; Quintanilla-Veja, B. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, v.216, p.216-224.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.05.001>

Powers, DA. Fish as model systems. *Science*, vol. 246, n° 4928, pp: 352-358. 1989.

<https://doi.org/10.1126/science.2678474>

Rabello-Gay, MN Teste de micronúcleo em medula óssea. In: *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética (ed) pp 83-90. 1991.

Rodriguez-Cea, A.; Ayllon, F.; Garcia-Vazquez, E. Micronucleus test in freshwater fish species: na evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. V.56 p.442–448. 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00073-3)

Schmid, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31: 9-15. 1975.

[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)

Simoniello, MF; Kleinsorge E; Loteste A; Gigena F; Poletta G; Loteste A; Parma J; Campana M. El sábalo, nuestro centinela. VI Congreso Latinoamericano De Mutagenesis, Carcinogenesis y Teratogenesis Ambiental XIV Congreso Argentino De Toxicologia I Jornada Transandina De Toxicologia. 2005.

Simoniello MF; Gigena F; Poletta G; Loteste A; Kleinsorge E; Campana M; Scagnetti J; Parma MJ. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish

Prochilodus lineatus (Pisces, Curimatidae). Bull Environ. Contam. Toxicol. v.83, p.155–158. 2009.

<https://doi.org/10.1007/s00128-009-9771-z>

Singh, NP; Mccoy, MT; Tice RR; Schneider, EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells Experimental Cell Research, 175, 1: 184-191. 1988.

[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

Souza, T Da S; Fontanelli, CS. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluents. Mutation Research, 605:87-93. 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.010>

Titenko-Holand, N; Windham, P; Kolachana, F; Reinisch, S; Parvatham, S; Osorio, AM; Smith, MT. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. Mutation Research. v.388, p.85-95. 1997.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(96\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(96)00140-4)

Trexler, JC. Phenotypic plasticity in poeciliid life histories. In The Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes (Poeciliidae) (Meffe, A. & Snelson, F. F., eds), pp. 201-213. 1989.

Udoiu, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. Aquatic Toxicology. v.79, p.201-204. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>

Villela, IV; Lau, A; Silveira, J; Prá, D; Rolla, HC; Silveira, JD. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. Genética Toxicológica. p.147-161. 2003.

Werner I, Deanovic LA, Hinton DE, Henderson JD, de Oliveira GH, Wilson BW, Krueger W, Wallender WW, Oliver MN, Zalom FG. Toxicity of stormwater runoff after dormant spray application of diazinon and esfenvalerate (Asana) in a French prune orchard, Glenn county, California, USA. *Bull Environ Contam Toxicol* 68 :29–36. 2002.

<https://doi.org/10.1007/s00128-001-0215-7>

WHO, O. Methyl Parathion (Environmental Health Criteria-EHC145, 1992). International Programme on Chemical Safety, 145. Environmental Health Criteria World Health Organization, Geneva, p.1–135. 1993.