

APLICABILIDADE DE ENSAIOS DA GENÉTICA TOXICOLÓGICA NO BIOMONITORAMENTO DE AMBIENTES AQUÁTICOS E PROMOÇÃO DA SAÚDE HUMANA.
GENETIC TOXICOLOGY TESTING APPLICATION ON BIOMONITORING AQUATIC ENVIRONMENT AND HEALTH PROMOTION

Raquel Vaz Hara
*Bruno Pizzaia Vasques Lopes**
Fernando Pereira dos Santos
*Rodrigo Juliano Oliveira***

RESUMO:

Muitos resíduos urbanos, industriais e agrícolas podem acrescentar uma quantidade significativa de contaminantes às águas superficiais tornando-as um grave problema para a saúde dos organismos que interagem com esse ecossistema e em especial à saúde humana. Devido à importância da qualidade da água para a saúde, testes de toxicidade e genotoxicidade têm sido utilizados para sua avaliação. Essa revisão bibliográfica destaca a importância do monitoramento ambiental, devido ao intenso lançamento de efluentes de origens industriais, urbanos e agrícolas em corpos d'água que podem conter substâncias nocivas que possivelmente acarretam danos ao DNA dos organismos vivos, que tem como habitat esta água e que são capazes de afetar indiretamente os seres humanos por meio de a cadeia alimentar e/ou diretamente no caso de banhistas e devido a outras atividades aquáticas.

20 **PALAVRAS-CHAVE:** Monitoramento ambiental; Allium cepa; Ensaio do Cometa; Teste do Micronúcleo

ABSTRACT:

A lot of urban, industrial and agricultural waste can add a significant quantity of contaminants into the superficial waters causing a serious damage to the bodies that interact with this ecosystem especially to the human health. Toxicity and genotoxicity testes are being taken to valuate the water due to the importance of the quality of it to our heath. This bibliographic revision highlights the environmental monitoring importance due to the abundant liquid industrial, urban and agricultural waste in water bodies which might contain harmful substances that possibly lead to living organisms DNA damages, which have this water as an habitat and are able to affect indirectly the human being through the food chain and/or directly in case of bathers and others water activities.

KEY WORDS: Environmental monitoring; Allium cepa; Comet assay; Micronucleus assay.

INTRODUÇÃO

A maioria dos produtos químicos apresenta potencial mutagênico/cancerígeno, e estes estão presentes no meio ambiente, tais como rios, lagos e ar, diariamente podem ser também en-

* Acadêmicos do Centro Universitário Filadélfia – UniFil – Curso de Biomedicina. email: raquel.hara@hotmail.com; 33757440; Av. JK, 1626 Centro; CEP: 86.020-000 - Londrina-PR

** Docentes do Centro Universitário Filadélfia – UniFil – Curso de Biomedicina. Email: fernando.santos@unifil.br; 33757440; Av. JK, 1626 Centro; CEP: 86.020-000 - Londrina-PR

contrados nos alimentos e na água utilizada para consumo humano (DEGUCHI et al., 2006). Os principais causadores por essas descargas exacerbadas de substâncias malélicas no meio ambiente são indústrias, atividades urbanas e agrícolas, sistemas de tratamento de esgotos e refinarias de petróleo (VANZELLA, 2007). Porém convém ressaltar que esses contaminantes acumulam-se e permanecem nesse meio acarretando uma ameaça para os organismos vivos (CAVAS, 2005a). Surge, assim, a importância de buscar um sistema de fornecimento de água limpa e segura para consumo humano, para a agricultura e também para o lazer (FRENZILLI, 2008).

Segundo Villela et al. (2006), estas mudanças na composição da água provocarão, evidentemente, efeitos deletérios sobre os organismos que habitam esses ecossistemas. Por isso debatem-se com frequência os meios de avaliação dos danos genéticos em organismos aquáticos que foram expostos a contaminantes (CAVAS, 2005a). Devido à necessidade de um período longo para relacionar os efeitos deletérios e os possíveis contaminantes de águas, os estudos epidemiológicos não são utilizados para detectar tais agentes (VILLELA et al, 2006).

Assim, verifica-se a necessidade de utilização de marcadores biológicos confiáveis para contribuir na identificação da relação causal entre a exposição a contaminantes e o aumento dos riscos dos efeitos, sobre os indivíduos e as populações, que ocasionam a diminuição da integridade do ecossistema (BOLOGNESIM et al., 2006) e correlacionam-se com o desenvolvimento de doenças em especial em humanos. Logo se percebem os biomarcadores como indicadores sensíveis que detectam tanto a exposição a substâncias tóxicas, quanto os seus efeitos devido à distribuição dos xenobióticos pelos tecidos (ANDRADE, 2004; BENASSI et al., 2006).

Como se sabe, os efluentes industriais podem gerar efeitos genotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos, embriotóxicos e uma série de distúrbios genéticos responsáveis, por exemplo, por síndromes genéticas determinadas em especial por ruptura química. Por isso, são indispensáveis ensaios que sejam sensíveis para avaliar o potencial genotóxico dessas substâncias (CAVAS, 2005b; KLOBUCAR et al., 2002). Um dos métodos mais apropriados para analisar a contaminação genotóxica da água é a análise de alterações do DNA dos organismos aquáticos. Estes estudos apresentam resultados importantes, em diferentes espécies, mesmo quando as concentrações dos poluentes aos quais os organismos biomarcadores estão expostos são pequenas (FRENZILLI, 2008).

De acordo com Cavas (2005a), para detectar a mais ampla gama de danos genéticos, é necessário utilizar ensaios com organismos eucariontes. Vários peixes ósseos estão sendo utilizados para o estudo da mutagenicidade, clastogenicidade e efeitos teratogênicos de contaminantes ambientais, pois esses organismos acumulam estas substâncias de dois modos, direto e indireto. Direto pelo consumo ou contato com a água contaminada e indireto pelo consumo de outros organismos contaminados presentes no ambiente (MATSUMOTO et al, 2005).

Para Benassi et al. (2006), uma grande parcela de contaminação das águas é causada pela presença de metais pesados que na maioria das vezes são altamente tóxicos e, por conseguinte, deveriam ser removidos para atender aos rigorosos padrões de qualidade da água. No entanto, muitos métodos não são satisfatórios devido ao seu alto custo e/ou por não ser possível a remoção de íons metálicos com baixa concentração.

Outros produtos que são diariamente liberados no ambiente são os agrotóxicos utilizados para aumentar a produção agrícola, principalmente no cultivo e pastagem (CAVAS & KONEN, 2007). Sabe-se, então, que é imprescindível o uso desses produtos químicos na agricultura moderna (GRISOLIA, 2002). No entanto, o uso indiscriminado e irracional tem criado grandes problemas de saúde pública. Estas questões de saúde pública são ainda agravadas quando se observam relatos que afirmam que os agrotóxicos não afetam somente os organismos-alvos, mas também ambiente

aquático e toda uma cadeia alimentar (CAVAS & KONEN, 2007)

TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo é o método mais empregado entre os diversos testes existentes, por causa da sua comprovada aptidão nas espécies de peixes, cujos numerosos e muitas vezes minúsculos cromossomos dificultam o uso de testes baseados em metáfases (CAVAS, 2005b; FRENZELLI, 2008).

Esta técnica é uma ferramenta importante para o monitoramento ambiental, pois atua como um bioindicador que consegue avaliar a mutagenicidade do ecossistema e indicar se os agentes presentes são responsáveis em causar danos genéticos e transformações neoplásicas nos organismos presentes em tais locais (SOUZA, 2006).

O teste baseia-se em analisar fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram agregados ao núcleo formado após a divisão celular, devido à ausência de centrômero, danos ou talvez um defeito na citocinese, por exemplo, (BOLOGNESIM et al, 2006; ERGENE et al, 2007). Estes micronúcleos são intracitoplasmáticos, menores que o núcleo principal e apresentam massas de cromatinas (GRISOLIA, 2000). Então, a presença de um micronúcleo fora do núcleo principal é consequência de um dano, esses danos são irreparáveis, pois são classificados como clastogênicos, aneugênicos ou lesões genômicas (FRENZELLI, 2008).

Neste teste podem-se observar tanto as hemácias, quanto as células do fígado, da guelra e também das brânquias (BOLOGNESIM et al, 2006; CAVAS, 2005b). Bolognesim et al. (2006) discute a utilização de cada uma dessas células e concluiu que o epitélio branquial é o principal alvo dos contaminantes ambientais e devido a isso apresentam uma alta sensibilidade. Já as células da guelra e os hepatócitos não são muito utilizados por causa da dificuldade dos procedimentos e pelo baixo índice de mitoses, respectivamente, e os tecidos hematopoiéticos, que apresentam um alto índice de mitoses, podem favorecer uma resposta rápida.

Nos peixes, diversas anomalias nucleares têm sido descritas e classificadas, estas se expressam simultaneamente com o micronúcleo, porém não há uma explicação para seu surgimento, mas são consideradas indicadoras de danos genotóxicos complementando os resultados (CAVAS, 2003; ERGENE et al, 2007).

Ensaio do Cometa

Frenzelli (2008) também relata sobre outra técnica que foi consagrada há 15 anos e que hoje é denominada de ensaio do cometa. O ensaio do cometa é um teste genotóxico rápido, simples e sensível capaz de detectar danos no DNA de células individuais induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (ANDRADE, 2004; MATSUMOTO et al., 2005).

O ensaio do cometa é útil para detectar danos recentes que podem ser reparados e que são ocasionados por compostos que não têm a propriedade de se bioacumular com facilidade no meio aquático (FRENZELLI, 2008). Portanto este teste se destaca nos estudos de substâncias mutagênicas que afligem o ambiente, como na toxicologia genética, especialmente, ecogenotoxicologia (DEGUCHI et al., 2006; PAVLICA et al., 2000).

A vantagem dessa técnica, que a diferencia de outros métodos, é que requer um pequeno número de células e as células mitoticamente ativas não precisam ser analisadas possibilitando a análise de qualquer núcleo celular (PAVLICA et al., 2000).

22

ALLIUM CEPA

Muitas plantas, utilizadas em testes, servem como modelo para rastreamento genético e para o monitoramento ambiental e demonstram uma alta sensibilidade para detectar os fatores da poluição ambiental e a toxicidade dos compostos químicos, além de avaliar as propriedades dos potenciais antimutagênicos (LEME, 2007; KURAS, 2006).

Entre essas espécies de plantas superiores que são utilizadas como organismo teste, o *Allium cepa* destaca-se, desde 1938, como um padrão genético para o acompanhamento dos poluentes ambientais (KURAS, 2006; LEME, 2007).

Segundo Fátima (2004), *Allium cepa* é uma espécie comum de cebola e é muito utilizada como aromatizante vegetal em todo o mundo. Esta planta possui grandes e poucos cromossomos ($2n = 16$), o que permite uma melhor avaliação dos danos cromossômicos e/ou distúrbios na divisão celular (LEME, 2007). Segundo Grover (1998) e Turkoglu (2008) a vantagem dos bioensaios vegetais sobre os bioensaios animais é que o vegetal é considerado menos dispendioso, mais sensível e de grande facilidade para realizar os procedimentos.

A comprovação da eficiência dos vegetais para ensaios genotóxicos no monitoramento ambiental, deu-se através de estudos internacionais colaborativos que receberam o apoio do Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), da Organização Mundial de Saúde (OMS) e também do E.U. Environmental Protection Agency (E.U. EPA) (TURKOGLU, 2008).

A presença de micronúcleos no meristema do *Allium cepa*, demonstra o efeito clastogênico e aneugênico, tanto da atmosfera quanto da água e do solo. Muitos autores relatam que as alterações cromossômicas mais observadas são: c-metáfases, quebras cromossômicas, cromossomos grudados, pontes, células binucleadas e células com micronúcleos (MATSUMOTO et al., 2005).

23

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão sugere conscientização da população humana para que não se polua os diferentes ambientes e em especial o aquático. Além disso, indica que há testes eficientes, ensaio do cometa, micronúcleo e *Allium cepa*, para o monitoramento ambiental. Logo, a correta aplicação destes testes permite comprovar se um determinado ambiente está ou não contaminado por xenobióticos que podem correlacionar-se à instabilidade genética. Estas alterações genéticas por hora analisadas é uma questão de saúde pública, em especial, por estarem relacionadas ao desenvolvimento do câncer em populações humanas.

REFERÊNCIAS

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. *Mutat. Res.* 560 57–67, 2004.

BENASSI J. C.; LAUS R., GEREMIAS R. et al, Evaluation of Remediation of Coal Mining Wastewater by Chitosan Microspheres Using Biomarkers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 633–640, 2006.

R
E
V
I
S
T
A

BOLOGNESIM C.; PERRONE E.; ROGGIERI P. et al, Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology* 78S, S93–S98, 2006.

CAVAS 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* 74, 264–271, 2005a.

CAVAS T.; ERGENE-GÖZÜKARA S., Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81–91, 2003.

CAVAS 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* 43, 569–574, 2005b.

CAVAS T.; KONEN S., Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* vol. 22 n° 4, 263–268, 2007.

DEGUCHI Y., TOYOIZUMI T., MASUDA S. et al, Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat. Res.* 627, 178–185, 2007.

ERGENE S.; CAVAS T.; CELIK A. et al, Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16:385–391, 2007.

FATIMA R.A.; AHMAD M., Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment* 346, 256– 273, 2005.

FRENZILI G.; NIGRO M.; LYONS B.P., The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res.*, 2008.

GRISOLIA C.K., A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat. Res.* 518, 145–150, 2002.

GRISOLIA C.K.; STARLING F.L.R.M., Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat. Res.* 491 39–44, 2001.

GROVER I.S.; KAUR S., Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 183–188, 1999.

24

R
E
V
I
S
T
A

KLOBUCAR G.I.V.; PAVLICA M.; ERBEN R. et al, Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of fresh-water environments. *Aquatic Toxicology* 64, 15-23, 2003.

KURAS M.; NOWAKOWSKA J.; SLIWINSKA E., Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 211–221, 2006.

LEME D.M.; MARIN-MORALES M.A., Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. *Mutat. Res.* 650, 80–86, 2008.

MATSUMOTO S.T.; MANTOVANI M.S.; MALAGUTTI M.I.A. et al, 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. *Gen and Mol Bio*, 29, 1, 148-158, 2006.

PAVLICA M.; KLOBUCAR G.I.V.; MOJAS N. et al, Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res.* 490, 209–214, 2001.

SOUZA T.S.; FONTANETTI C.S., Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat. Res.* 605, 87–93, 2006.

TURKOGLU S., Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food and Chemical Toxicology*, 2008.

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. *Mutat. Res.* 631, 36–43, 2007.

VILLELA I.V.; OLIVEIRA I.M., SILVEIRA J.C. et al, Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutat. Res.* 628, 76–86, 2007.