



# ENSAIO DO COMETA E INDUÇÃO DE ANORMALIDADES ERITROCÍTICAS NUCLEARES PARA DETECÇÃO DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE NO PEIXE NEOTROPICAL *PROCHILODUS LINEATUS* EXPOSTOS À FRAÇÃO SOLÚVEL DA GASOLINA

Esther Pretti, Dalita Cavalcante, Juliana D. Simonato e Cláudia B. R. Martinez

Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina

## INTRODUÇÃO

O petróleo pode ser destilado em diversos produtos, como óleo diesel, gasolina, gás natural e durante esse processo de destilação e transporte, freqüentemente há vazamentos e derrames, contaminando solos e água. A toxicidade do petróleo é, em sua maioria, atribuída à sua parte solúvel (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2002) e seus hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, encontrados em efluentes de refinarias de petróleo, são descritos como os principais componentes capazes de causar danos no DNA (HAMOUTENE *et al.* 2002)

O objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel da gasolina (FSG) para o peixe *Prochilodus lineatus* através dos testes do cometa e da ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares.

O teste do cometa é utilizado para detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Uma vez que danos no DNA são freqüentemente célula e tecido específicos, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (TICE, 1995). O teste do cometa consiste na lise celular, relaxamento do DNA e eletroforese, sendo possível observar após coloração, os fragmentos de DNA provindos da quebra causada pelo agente xenobiótico, que, ao serem submetidos a eletroforese “correm” formando uma cauda.

Deve-se ter em mente que não existe célula sem dano no DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no DNA/célula. O que se faz, rotineiramente é modular as condições técnicas (tempo de relaxamento e eletroforese) para que um mínimo

de DNA migre da cabeça para a cauda do cometa nos controles negativos (TICE, 1995). Dentre as alterações eritrocíticas nucleares, a ocorrência de micronúcleos serve como o primeiro passo no estudo de qualquer substância mutagênica. O teste do micronúcleo é um teste rápido e sensível, tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais e numéricas (HEDDLE *et al.*, 1983). Também é um ensaio citogenético comumente usado em vários sistemas biológicos para o monitoramento de genotoxicidade ambiental (MERSCH & BEAUVAIS, 1997). Esse teste consiste na coloração de um esfregaço de sangue e contagem de eritrócitos para a quantificação de células contendo essas anormalidades, dentre outras, como a ocorrência de núcleos lobulados, segmentados e em forma de rim.

A escolha pelo peixe neotropical *Prochilodus lineatus* se deu principalmente por ser um animal de biologia e fisiologia conhecidas, além de ser sensível aos efeitos de poluentes, como a gasolina e pelo fato dos peixes serem capazes de bioacumulação devido à exposição direta a produtos químicos e ingestão de alimento contaminado. Além do fato desses animais incorporarem os poluentes presentes na água pela respiração, o fato de serem detritívoros também permite que eles incorporem os mesmos poluentes pela ingestão de sedimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção da fração solúvel da gasolina (FSG), uma parte de gasolina foi adicionada a quatro partes de água num aquário. A mistura foi então exposta à radiação solar por 6 horas, simulando um verdadeiro vazamento em condições tropicais. Após esse período a fase insolúvel foi descartada e a fase restante foi coletada e diluída a 5% com água e mantida sob aeração em um aquário de 100L. Os animais foram expostos a FSG ou apenas à água limpa (CTR) por 96 horas e o sangue periférico coletado pela veia caudal. As amostras de sangue

foram submetidas ao ensaio do cometa, no qual os eritrócitos foram lisados, seu DNA relaxado e submetido à eletroforese, após o material foi fixado e corado com Brometo de etídeo. Para obtenção do escore de acordo com o dano encontrado, foram contadas 100 células por animal em microscópio de fluorescência. Para a detecção de AENs foi feito um esfregaço com sangue e as lâminas foram deixadas para secar por 24 horas. Após esse período foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas com Giemsa (5%) durante 20 minutos. Foram contadas 3000 células por animal considerando as seguintes lesões nucleares: micronúcleo (M), núcleo lobado (L), núcleo segmentado (S) e núcleo em forma de rim (K).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a detecção de Alterações Eritrocíticas Nucleares foi dado como uma média (%) das somas (M+L+S+K) de todas as lesões observadas. Houve um aumento significativo ( $P=0,017$ ) na frequência de AEN em peixes expostos a FSG ( $3,83 \pm 3,12$ ,  $n=12$ ) em relação ao CTR ( $1 \pm 0,86$ ,  $n=9$ ).

Os resultados obtidos utilizando-se o ensaio do cometa em eritrócidos de *P. lineatus* expostos a FSG mostraram diferença significativa nos escores de peixes expostos à FSG ( $141,8 \pm 26,9$ ,  $n=12$ ) em relação aos CTR ( $96,5 \pm 9,95$ ,  $n=9$ ). Animais submetidos a FSG mostraram um aumento significativo de nucleóides com muito dano em relação ao seu controle negativo.

Esses resultados mostram um efeito genotóxico e mutagênico da gasolina, demonstrando a necessidade do desenvolvimento de estudos para testar os efeitos da gasolina em peixes neotropicais. Fica evidente assim a necessidade de efetiva fiscalização e monitoramento de estações de abastecimento e distribuição de derivados de petróleo no Brasil, para se ter um alerta precoce em casos de derrames antes que comunidades inteiras e até todo o ecossistema seja comprometido permanentemente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, V. M. F., VAL, W. P. Duncan, A. L. 2002.** Crude oil effects on fish of the amazon: Current Status. in: *Tropical Fish: News and Reviews*. Internation Congress on The Biology of Fish, 49 - 60.
- Hamoutene, D., Payne, J. F., Rahimtula, A., Lee, K. 2002.** Use of the Comet assay to assess

DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environment*, 54: 471-474.

**Heddle, J.A., Hite, M., Jrkhardt, B., Macgregor, J.T., Salamone, M.F. 1983** The Indutio of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Research*, 123: 61-118.

**Mersch, J. & Beauvais, M-N. 1997** The micronucleous assay in the zebra mussel, *Deissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research*, 383: 141-149.

**Tice, R. 1995** The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: Phillips, D. H.; Vennit, S. (Eds.). *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK. p. 315-339.