

II-341 - USO DE BIOMARCADORES PARA DETECTAR EXPOSIÇÃO À GENOTÓXICOS EM TILÁPIAS DO NILO CULTIVADAS COM ESGOTO DOMÉSTICO TRATADO

Cleto Augusto Baratta Monteiro ⁽¹⁾

Engenheiro Civil pela UFPE. Doutor em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Professor Adjunto do Departamento de Recursos Hídricos do Centro de Tecnologia da UFPI.

Suetônio Mota ⁽²⁾

Engenheiro Civil e Sanitarista. Doutor em Saúde Ambiental (USP). Professor Titular do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Emanuel Soares dos Santos ⁽³⁾

Engenheiro de Pesca pela UFC. Doutorando em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental, pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

André Bezerra dos Santos ⁽⁴⁾

PhD em Saneamento Ambiental pela Universidade de Wageningen, Holanda. Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante ⁽⁵⁾

Bióloga. Doutora em Biologia Celular e Molecular (UFRGS). Professora do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí. Professora da Faculdade NOVAFAPI (Teresina-PI).

Endereço ⁽¹⁾: Av. Rio Poti, nº 2033 aptº.401- B. Horto Florestal (Teresina-PI) – CEP: 64049-410 – Brasil – Tel: (86) 3232-5634 / e-mail: cleto_baratta@hotmail.com

RESUMO

O aproveitamento de águas residuárias é uma alternativa bastante difundida na atualidade. Uma das formas de reúso é na atividade piscícola, considerando-se que os efluentes das Estações de Tratamento de Esgotos do tipo lagoas de estabilização são fontes ricas em nutrientes que podem ser aproveitados pelos peixes. Entretanto, algumas restrições se apresentam com relação à qualidade dos animais para aproveitamento na alimentação humana. Esgotos domésticos urbanos tratados se constituem como recursos estratégicos, de importância social e econômica, e os peixes são considerados como excelentes bioindicadores de poluição da água, nos processos de monitoramento do ambiente aquático. Além do mais, os agentes químicos presentes no tratamento com águas residuárias, a exemplo do oxigênio e de compostos com cloro, são conhecidos como agentes genotóxicos e/ou mutagênicos. Assim sendo, o presente estudo objetivou a avaliação da ocorrência de mutagenicidade e anormalidades nucleares em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (tilápias do Nilo), cultivadas em esgoto doméstico tratado, e em água tratada, por meio do teste de micronúcleos, como biomarcador dos riscos de genotoxicidade. No delineamento experimental foram utilizados peixes dos tratamentos: T-01(água tratada com oferta de ração); T-02 (esgoto tratado sem ração e sem adição do air-lift); T-03 (esgoto tratado sem ração, com auxílio do air-lift). Para as análises de micronúcleos e de anormalidades nucleares, tais como cariorrexe (fragmentação nuclear) e cariólise (dissolução nuclear) foram coletadas amostras de sangue de 15 peixes do tratamento T-01; 27 peixes do tratamento T-02; 22 peixes do tratamento T-03; 15 peixes para o controle negativo (água de poço artesiano) e 15 para o controle positivo (metabissulfito de sódio). Foram avaliados 1000 eritrócitos para cada peixe, em microscopia óptica. Os dados obtidos para a frequência de micronúcleos em eritrócitos de tilápia não foram estatisticamente significativos para caracterizar um quadro de mutagenicidade. Entretanto, dados significantes para anormalidades nucleares foram identificados em eritrócitos das tilápias expostas aos tratamentos T-02 e T-03 em relação ao controle negativo. Esses resultados sugerem, como ação preventiva, o biomonitoramento da piscicultura em esgoto doméstico tratado, em função dos riscos de genotoxicidade, induzidos provavelmente pelos químicos usados no tratamento de águas, e pelo estresse promovido no ambiente (esgoto) de cultivo, além da intensa aeração nos tanques experimentais.

PALAVRAS-CHAVE: Água residuária, Biomarcadores, Genotoxicidade, Mutagenicidade, Piscicultura.

INTRODUÇÃO

A piscicultura realizada em esgotos domésticos tratados por estações de tratamento de esgotos do tipo lagoas de estabilização tem alcançado resultados promissores, principalmente, quanto aos aspectos zootécnicos que comprovam a capacidade nutricional do esgoto tratado na composição da dieta de peixes, como as tilápias. Os peixes são importantes indicadores de poluição da água e o teste de micronúcleos em tanques é um excelente indicador para investigar muitas classes de compostos mutagênicos e contaminantes químicos que atingem essa população de indivíduos, no ambiente aquático. A utilização dos eritrócitos desses animais permite uma rápida resposta sem sacrifício e sofrimento dos organismos utilizados no biomonitoramento (HOOFTMAN; RAAT, 1982).

Vários biomarcadores têm sido usados para detecção da exposição a genotóxicos em poluição de águas, e os eritrócitos de peixes podem ser usados como marcadores sentinelas da exposição a compostos mutagênicos (BOMBAIL *et al.*, 2001; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). Os micronúcleos são cromossomos ou fragmentos de cromossomos observados durante a anáfase da divisão celular, devido aos efeitos de agentes aneugênicos (perda de cromossomos) e clastogênicos (quebras de cromossomos), que depois na telófase dão origem aos pequenos núcleos. Estudos vêm sendo realizados para avaliação de químicos mutagênicos ou carcinogênicos em peixes (SANCHEZ-GALAN *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-CEA *et al.*, 2003).

Danos ao DNA são considerados os principais eventos causados por agentes genotóxicos que levam às mudanças hereditárias e ao desenvolvimento de doenças. Estes danos podem induzir à morte celular ou a eventos mutacionais e, também, iniciar uma transformação maligna (MOUSTACCHI, 2000, *apud*, FERREIRA; NEPOMUCENO, 2008). De acordo com Vargas *et al.* (2001) *apud* Ferreira; Nepomuceno, (2008), o lançamento de efluentes industriais em cursos hídricos impõe significativo risco aos ecossistemas, devido, principalmente, à sua composição química, contendo, em alguns casos, toxinas que podem ser genotóxicas.

A formação de anormalidades nucleares, tais como células binucleadas, brotos, fragmentação (cariorrexe) e dissolução nuclear (cariólise) em peixes foi descrita primeiramente por CARRASCO *et al.*, (1990). Entretanto, os mecanismos dessas anormalidades ainda não estão bem explicados, muito embora já sejam consideradas como indicadores de danos genotóxicos, facilmente identificadas com o teste de micronúcleos (CAVAS; KONEN, 2007). Considerando que o esgoto tratado por estações de tratamento de esgotos apresentam riscos constantes da presença de contaminantes de origens diversas, é fundamental que a utilização de águas residuárias, principalmente na piscicultura, para produção de proteína animal de qualidade, seja acompanhada de testes para certificar a condição sanitária do pescado produzido.

O presente estudo teve como objetivo a aplicação de biomarcadores de genotoxicidade, com o teste de micronúcleo, para avaliar os riscos de mutagenicidade em peixes *Oreochromis niloticus* (tilápias do Nilo) cultivados em tanques experimentais, e abastecidos com esgoto tratado pela estação de tratamento ETE-Leste em Teresina (PI). Por outro lado, a análise de qualidade da água do cultivo é investigada indiretamente pela avaliação dos bioindicadores (peixes) de poluição, enquanto que a avaliação dos riscos de genotoxicidade provocados por químicos presentes no tratamento é identificada na análise dos eritrócitos de peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na unidade Experimental de Reúso, situada na área da Estação de Tratamento de Esgotos da zona Leste de Teresina (ETE-Leste), de propriedade da Águas e Esgotos do Piauí S.A (AGESPISA), localizada no bairro Ininga, nos limites do campus universitário da Universidade Federal do Piauí, às margens do Rio Poti. A estação de tratamento de esgotos ETE-Leste é um sistema de tratamento biológico composto por uma lagoa facultativa aerada mecanicamente, com uma área de 1,1 ha e profundidade útil de 2,5 m, em série com duas lagoas facultativas de 3,5 ha e profundidade 2,0m, e duas outras de maturação, com área de 3,4 ha e profundidades de 1,5m.

A Figura 1 apresenta uma vista aérea do conjunto de lagoas da ETE-LESTE e a organização dos tanques na piscicultura experimental.



Figura 1 - Vista aérea ETE da zona Leste de Teresina e tanques experimentais.

A configuração da unidade experimental destinada ao cultivo de tilápias em esgoto doméstico no âmbito deste trabalho utilizou 03 tipos de tratamento com seis repetições cada, conforme apresentado na Figura 1 e descrição das seguintes hipóteses testadas: Tratamento T-01, com água tratada procedente da rede de abastecimento d'água da cidade, que foi utilizada para suprimento e renovação do volume d'água nos tanques experimentais de nº(s): Tq-01; Tq-02; Tq-03; Tq-04; Tq-05; Tq-06; neste tratamento foi fornecida ração comercial balanceada indicada para cada fase do desenvolvimento dos peixes; Tratamento (T-02), que utilizou o esgoto doméstico tratado por lagoas de estabilização, para o abastecimento dos tanques experimentais de nº(s): Tq-07; Tq-08; Tq-09; Tq-10; Tq-11; Tq-12; não foi fornecido qualquer tipo ou quantidade de ração para esse tratamento; Tratamento (T-03) - para esse tratamento foi repetido o mesmo protocolo adotado no tratamento T-02, com a adição de oxigênio gerado por sistema air-lift, abastecendo os tanques nº(s): Tq-13; Tq-14; Tq-15; Tq-16; Tq-17; Tq-18.

Nos dezoitos (18) tanques experimentais foram estocados alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), revertidos sexualmente para machos, com utilização do hormônio 17- α -metiltestosterona, e distribuídos em lotes de 10 indivíduos por tanque (aproximadamente 3 alevinos /m²). O período de cultivo foi de 154 dias (dezembro de 2009 a junho de 2010). Para o tratamento (T-03), que utilizou o esgoto tratado com aeração mecânica, foi projetado e implantado um sistema automático para garantir o suprimento de ar nos tanques de nº(s) 13 a 18, no período noturno, em que se verifica uma maior redução na disponibilidade de OD. Este sistema foi composto de 01 compressor radial da IBRAM, com motor elétrico trifásico de 1,3 CV de potência e uma capacidade operacional de injetar até 1,7 m³/min de ar na rede de tubos PVC Ø25mm.

O teste de micronúcleo foi realizado com adaptações no protocolo usado por Cavas; Koen (2007), para as análises de micronúcleos e de anormalidades nucleares, tais como cariorrexe (fragmentação nuclear) e cariólise (dissolução nuclear). Foram coletadas amostras de sangue de 15 peixes do tratamento (T-01), 27 do tratamento (T-02) e 22 do tratamento (T-03); 15 peixes foram avaliados no controle negativo (água de poço artesiano) e 15 para o controle positivo (metabissulfito de sódio). As amostras de sangue periférico das brânquias foram obtidas por punção (com seringa) na região branquial, muito rica em vasos sanguíneos. O toque com o bisel da agulha nas lâminas branquiais provoca um pequeno sangramento, do qual obtém-se uma gota de sangue, usada na confecção do esfregaço sanguíneo de duas lâminas para cada peixe e, depois de fixadas em etanol puro por 20 minutos, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa a 10%, por 25 minutos.

Finalmente, foram avaliados 1000 eritrócitos para cada peixe, em microscopia óptica, com a objetiva de 100 X, na observação das lâminas pelo Laboratório de Citogenética e Genética Toxicológica da Universidade Federal do Piauí. As análises estatísticas dos parâmetros avaliados foram realizadas com o *software BioEstat 4.0*, utilizando a Análise de Variância – ANOVA, e o teste de Dunnett's para significância de 5,0 % ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Os dados obtidos para a frequência de micronúcleos em eritrócitos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram estatisticamente significantes ($P < 0,0001$), somente no tratamento (T-02), em relação ao controle negativo, e significativo para $P < 0,05$ em relação aos eritrócitos dos peixes do tratamento (T-01), conforme está demonstrado na Tabela 1 e Figura 2.

Tabela 1- Avaliação da mutagenicidade em tilápias do Nilo criadas em tanques experimentais, para diferentes tratamentos, com a aplicação do teste de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico.

Tratamento	N	MN/1000 eritrócitos ¹	% MN/1000 eritrócitos ¹
CN (água de poço artesiano)	15	0,46 ± 0,16	0,04 ± 0,01
CP peixes expostos ao metabissulfito de sódio	15	4,7 ± 0,97 ^{a***}	0,47 ± 0,09 ^{a***}
Tratamento (T-01) (água sem Cloro)	15	0,7 ± 0,18	0,07 ± 0,01
Tratamento (T-02) (esgoto tratado com cloro)	27	4,6 ± 0,72 ^{a***, b*** b*}	0,46 ± 0,07 ^{a*** b*** b*}
Tratamento (T-03) (esgoto tratado + Ar (Oxigênio))	22	2,0 ± 0,44	0,20 ± 0,04

N (número de peixes); ¹ Média ± Erro padrão. ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test. Significância em ^a P<0,0001 em relação ao controle negativo e ^{b***}P<0,0001 e ^{b*}P<0,05 em relação aos tratamentos (T-01) e (T-03); CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e MN (Micronúcleos).

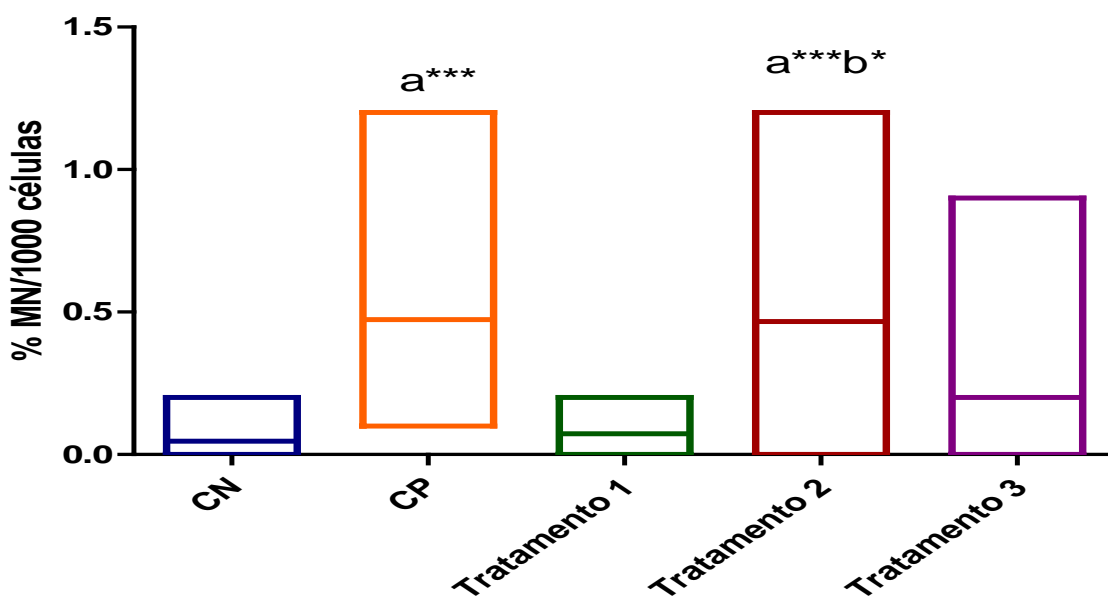


Figura 2 - Micronúcleo em eritrócitos de Tilápias do Nilo em tanques, expostos a diferentes tratamentos. N (número de peixes);¹ Média ± Erro padrão. ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test. Significância em ^a P<0,0001 em relação ao controle negativo e ^{b*}P<0,0001 e ^{b*}P<0,05 em relação aos tratamentos (T-01) e (T-03), respectivamente. CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e MN (Micronúcleos).**

A Figura 3 apresenta uma fotomicrografia de micronúcleo em eritrócitos de peixes. A significância observada não indica mutagenicidade em eritrócitos de tilápia do Nilo, pois, segundo Heddler (1973) e Schmid (1975), para 1.000 células por animal, a mutagenicidade pode ser observada se a frequência de micronúcleos estiver acima de 0,5%, aspecto não observado em qualquer dos tanques em estudo. Dessa forma, os dados não indicam a presença de substâncias potencialmente mutagênicas adicionadas nos tratamentos em estudo. O aumento da frequência de micronúcleos pode ser explicado por prováveis fatores relacionados ao estresse ambiental, tais como a incidência de radiações UV e, especialmente, as radiações UVA, além das elevadas temperaturas (SAYED *et al.*, 2007).



Figura3- Fotomicrografia de micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico de tilápias do Nilo. Laboratório de citogenética e genética toxicológica.

Cabe também enfatizar que as tilápias deste experimento foram previamente revertidas para machos com a utilização de hormônio na fase larval. Pandian; Sheela (1995), citados por Leonhart (1997), sugerem que os resíduos dos esteróides administrados são carcinogênicos e eventualmente poderiam afetar o consumo. Entretanto, o esteróide 17- α -metiltestosterona é eliminado logo após o término do tratamento (reversão), não sendo mais encontrado em peixes de até 1g, indicando não haver dano ao consumidor, já que o peixe é criado muitos meses sem esteróides antes do abate (LEONHART, 1997).

Ferreira; Nepomuceno (2008), ao estudarem a poluição do rio Santa Catarina no município de Vazante (MG), detectaram, por meio do teste do micronúcleo em peixes denominados Bicuda (*Boulengerella ssp*), que as elevadas concentrações de agentes clastogênicos e aneugênicos presentes neste curso d'água influíram decisivamente na frequência de micronúcleos observados, tornando-as estatisticamente significativa se comparadas com as frequências obtidas no grupo de controle.

Por outro lado, Adam *et al.*, (2010) aplicaram o teste de micronúcleos em células sanguíneas de peixes da espécie *Poecilia vivipara*, provenientes do rio Belém, na cidade de Curitiba (PR), onde foram avaliados os efeitos genotóxicos, identificados pela ocorrência de micronúcleos, em razão da intensa atividade antrópica na região. As análises para verificação da ocorrência de metais revelaram elevadas concentrações de zinco, cobre e níquel, com importante repercussão no aumento da frequência de micronúcleos, comparando-se com o controle negativo do experimento.

Na Tabela 2 estão apresentados dados significantes ($P < 0,001$; $P < 0,01$ e $P < 0,05$) que foram identificados em eritrócitos das tilápias expostas aos tratamentos (T-02) e (T-03), respectivamente. Nas Figuras 4 (A) e 4 (B) são mostradas formações de anormalidades nucleares, tais como células binucleadas, brotos, fragmentação (cariorrexe) e dissolução nuclear (cariólise) em peixes, como foram descritas por Carrasco *et al.* (1990). Essas anormalidades são consideradas como indicadores de danos genotóxicos, facilmente identificadas com o teste de micronúcleos, muito embora os mecanismos dessas anormalidades ainda não estejam bem explicados.

Tabela 2-Avaliação de apoptose, pelas anormalidades nucleares cariorrexe e cariólise, em eritrócitos de Tilápias do Nilo criadas em tanques experimentais em submetidos a diferentes tratamentos.

Tratam.	N	Cariorrexe/1000 eritrócitos ¹	Cariorrexe /1000 eritrócitos ¹ (%)	Cariólise/1000 eritrócitos ¹	Cariólise/1000 eritrócitos ¹ (%)
CN	15	1,4 ± 0,54	0,14 ± 0,05	3,3 ± 0,75	0,32 ± 0,07
CP	15	8,1 ± 1,40 ^{a**}	0,81 ± 0,14 ^{a**}	15,40 ± 2,50 ^{a**}	1,50 ± 0,25 ^{a**}
(T-01)	15	3,70 ± 1,00	0,31 ± 0,10	3,13 ± 0,92	0,31 ± 0,09
(T-02)	27	13,0 ± 1,40 ^{a*** b*** b*}	1,4 ± 0,20 ^{a*** b*** b*}	17,36 ± 1,92 ^{a*** b*** b}	1,73 ± 0,19 ^{a*** b*** b}
(T-03)	22	1,47 ± 0,30	0,14 ± 0,03	13,29 ± 1,84 ^{a*** b**}	1,32 ± 0,18 ^{a*** b**}

N (número de peixes); ¹ Média ± Erro padrão. ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test. Significância em ^a P<0,0001 e ^{**}P<0,01 em relação ao controle negativo e ^{b***}P<0,0001 e ^{b**}P<0,05 em relação ao tratamentos (T-01); CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e MN (Micronúcleos).

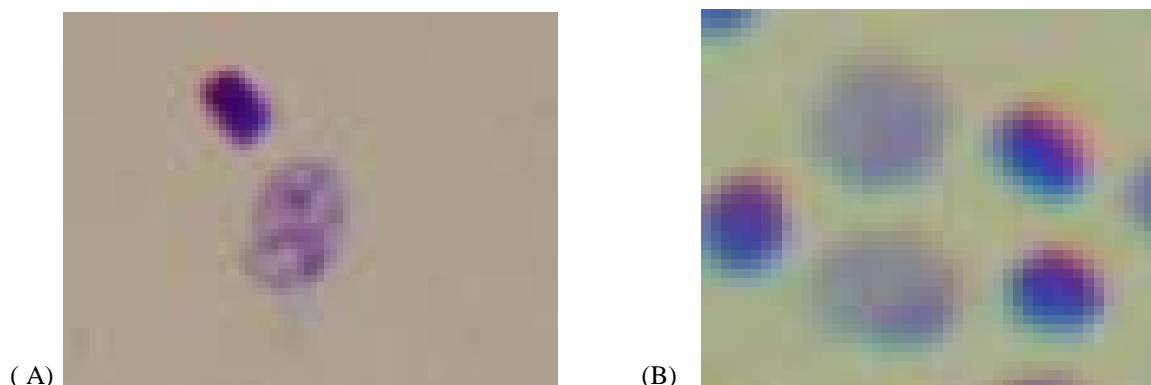


Figura 4- Fotomicrografia de eritrócitos de sangue periférico de Tilápia do Nilo. (A) células em cariorrexe (B) células em cariólise.

Os dados relativos às anormalidades nucleares sugerem danos ao DNA, possivelmente originados pelo *estress* oriundo das radiações UV e altas temperaturas, especialmente para o tratamento (T-03), pois, devido ao superávit de oxigênio nos tanques, com intensa aeração mecânica, gerou-se um ambiente favorável à produção de espécies reativas de oxigênio, as quais, provavelmente, não foram reparadas e os mecanismos para apoptose foram observados pelo aumento das frequências de cariorrexe e de cariólise, apresentadas na Figura 5.

Pinheiro *et al.* (2010), em estudo realizado com tambaquis, *Colossoma macropomum*, juvenis, expostos à ação de metilmercúrio (MeHg), que é mais tóxico que o mercúrio metálico, observaram que os micronúcleos típicos em eritrócitos das amostras de sangue periférico dos peixes apresentavam baixo índice de frequência, semelhante ao grupo de controle, cujos indivíduos não foram expostos ao agente xenobiótico. Entretanto, o número de alterações morfonucleares foi estatisticamente significativo, confirmando que o MeHg é um xenobiótico importante, por causar danos ao material genético dos organismos. Os resultados, além de comprovarem a ação mutagênica do MeHg, reforçam a importância do Teste do Micronúcleo na avaliação de efeitos genotóxicos em peixes.

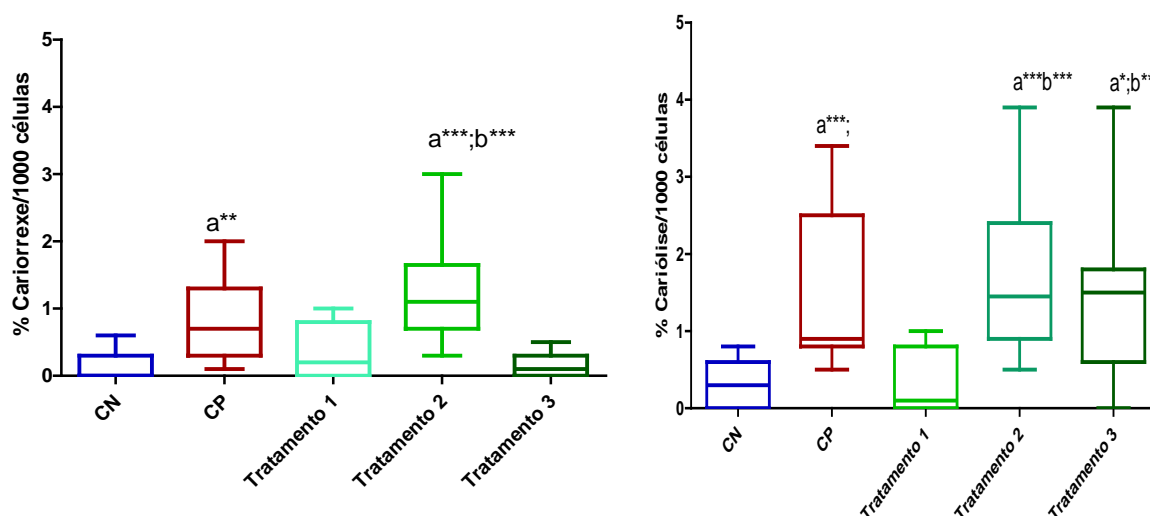


Figura 5- Avaliação apoptótica em eritrócitos de Tilápia do Nilo em tanques de água com diferentes tratamentos. ANOVA, *Dunnnett's Multiple Comparison Test*. Significância em ^a $P < 0,0001$ e ^{} $P < 0,01$ em relação ao controle negativo e ^{b***} $P < 0,0001$ e ^{b**} $P < 0,05$ em relação ao tratamento (T-01).**

Acumulação de danos ao DNA pode ocorrer com o aumento do número de eventos que interferem na estabilidade do DNA. Entretanto, os mecanismos de reparo em peixes não são tão eficientes, como acontecem em mamíferos (ESPINA; WEIS, 1995). Dessa forma, é provável que tenha acontecido danos ao DNA nos tratamentos (T-02) e (T-03). Os resultados sugerem que eritrócitos de peixes expostos a agentes mutagênicos presentes em ambientes agressivos estão suscetíveis de desenvolverem anomalias nucleares, que são identificadas eficientemente com aplicação do teste de micronúcleos.

CONCLUSÕES

As substâncias químicas usadas em tratamento de águas oriundas de esgotos urbanos, a exemplo do cloro, podem produzir danos ao DNA de eritrócitos de tilápias do Nilo, ocasionando danos fixos, observados pelo aumento da frequência de micronúcleos em peixes. Entretanto, o percentual da frequência de micronúcleos, por não ter superado o percentual de 0,5 %, apenas sugere riscos de mutagenicidade, mas não se verifica um cenário mutagênico já implantado.

O aumento de anormalidades nucleares indicativas de danos ao DNA, provavelmente não reparados, sugere etapas apoptóticas do tipo cariorrexe (fragmentação nuclear) e do tipo cariólise (dissolução nuclear). Também foram observadas nas tilápias do Nilo, cultivadas em esgoto tratado. A eventual presença de resíduos de compostos clorados no ambiente aquático, associada com aeração eletro mecânica do tratamento T-03, pode ter induzido à formação de espécies reativas de oxigênio, com efeitos importantes na ocorrência de anormalidades nucleares.

A piscicultura em águas oriundas de esgotos urbanos tratados, com a eventual presença de resíduos dos compostos clorados, e a utilização de aeração mecânica, deve ser realizada com a devida cautela e biomonitoramento permanente de genotoxicidade em peixes, com o uso de biomarcadores sensíveis, a exemplo do teste de micronúcleos em eritrócitos, que identificam as condições de mutagenicidade pela frequência de micronúcleos e as anormalidades nucleares, indicativas de apoptose, tais como as cariorrexes e cariólises. Além disso, os resultados obtidos com a realização do teste de micronúcleo em pescados produzidos em uma piscicultura possibilitam uma avaliação preliminar da qualidade da água utilizada nos viveiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAM, M. L. *et al.*, Environmental Degradation at a Public Park in Southern Brazil as Revealed Through a Genotoxicity Test (MN) on Peripheral Blood Cells from *Poecilia vivipara*. Water Soil Pollut 211: 61-68, DOI 10. 1007/s 11270-009-0280-9 (2010).
2. BOMBAIL, V. D. AW, GORDON, BATTY, E. J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland, Chemosphere 44 p 383–392. (2001).
3. CARRASCO, K., TILBURY, K. L. AND MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can. J. Fish Aquat. Sci., 47, 2123–2136. (1990).
4. ESPINA, N. G. AND WEIS, P. DNA-repair in fish from polluted estuaries. Mar. Environ. Res., 39, 309–312. (1995).
5. FERREIRA, G. dos R.; NEPOMUCENO, J.C. Poluição do rio Santa Catarina no Município de Vazante (MG). Perquirere- Revista Eletrônica da Pesquisa – ISSN 1806-6399 – Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão (NIPE) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). 5ª Edição, ano 5, junho de (2008).
6. GALINDO, T. P; MOREIRA, L.M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837), (Teleostei, Gobiidae). Genetics and Molecular Biology, 32 (2), 394-398. (2009).
7. GRISOLIA, C. K; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. Mutation Research, 491, 39-49,(2001).
8. HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat.Res.18, p 307–317.(1973)
9. HOOFTMAN, R.N., RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastearn mudminnow *Umbra pigmaea* by ethil methanesulphonate.Mutat. Res.104, 147–152.(1982).
10. INSTITUTO DO MILÊNIO: Uso e Apropriação de Recursos Costeiros. Disponível em: <http\200.232.197/milênio/métodos.htm> Acesso em : 19/11/2004.
11. LEMOS, C. T; RODEL, P. M;TERRA, N. R; OLIVEIRA. N. C. D; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66 , 391-401. (2007).
12. MITCHELMORE, C.L. CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, Mutat. Res. 399, p 135–147. (1998).
13. PINHEIRO, *et al.*, Avaliação Citogenética de Eritrócitos de Tambaquis (*Colussoma macropomum*) sob Exposição de Metil Mercúrio. 62ª Reunião Anual da SBPC, Natal (RN), (2010).
14. RODRIGUEZ-CEA, A., AYLLON, F., GARCIA-VAZQUEZ, E., Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys.Ecotoxicol.EnvIRON. Saf.56, 442–448.(2003)
15. SANCHEZ-GALA´ N, S., LINDE, A.R., AYLLON, F., GARCIA-VAZQUEZ, E., Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals.Ecotoxicol.EnvIRON.Saf.49, 139–143.(2001)
16. VARGAS, V. M. F; MIGLIAVACCA, S. B.; MELO, A. C.; HORN, R.C; GUIDOBONO, R. R.; FERREIRA, I.C. F. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influenceof heavy metals and organic contaminants. Mutation Research, 490, 141-158. (2001).
17. SCHMID, W., The micronucleus test. Mutat. Res. 31, 9–15.(1975).
18. YARED, E., MCMILLIAN TJ., MARTIN FL. Genotoxic effects of oestrogens in brest cells detected by the micronucleus assay and the comet assay. Mutagenesis. 17:345-352.(2002)