

Avaliação de Genotoxicidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de *Danio rerio*

*Assessment of water genotoxicity from an urban river using study of
Danio rerio blood cells*

Ralph Gruppi Thomé¹, Priscyla Martins da Silva¹, Hélio Batista dos Santos¹.

¹Universidade Federal de São João del Rei - Campus Centro Oeste Dona Lindu. Divinópolis-Minas Gerais, Brasil.

Resumo

A alta taxa mitótica dos tecidos hematopoiéticos proporciona reposta rápida à exposição genotóxica, revelado como dano cromossômico em células sanguíneas. Assim, objetivou-se biomonitorar as águas do rio Itapecerica, no município de Divinópolis, através da frequência de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN) em eritrócitos além da contagem de leucócitos de sangue periférico de *Danio rerio*. Os pontos escolhidos apresentavam condições ambientais diversas: ponto 1 centro de Divinópolis (área comercial e esgoto doméstico), ponto 2 a jusante da cidade (área com vegetação marginal preservada), ponto 3 córrego afluente do rio Itapecerica (drenagem fluvial e esgoto doméstico) e ponto 4 a montante da cidade (ponto referência). Os peixes foram adquiridos comercialmente e acondicionados em quatro aquários (n=5). Distensões de sangue periférico foram obtidas por punção da veia caudal e coradas com Giemsa. As análises de frequência de MN, AN e leucócitos foram realizadas por contagem, em microscopia de luz, da ocorrência desses eventos e tipos celulares a cada mil eritrócitos. Os maiores valores de ocorrência de MN e AN, assim como de leucócitos, foram registrados nos animais expostos à água proveniente dos pontos 1 e 3. Houve diferença estatística significativa na comparação entre o ponto 1 e os pontos 2 e 4 em relação a todos os parâmetros estudados. Os resultados do presente estudo permitem inferir a presença de substâncias genotóxicas no ponto 1 e serve de alerta às autoridades contribuindo para o avanço de políticas de saneamento, uma vez que essas ações são fundamentais para traduzir o princípio do desenvolvimento sustentável.

Palavras-chave: Biomonitoramento, impacto ambiental, peixes, histologia, teste do micronúcleo

Autor correspondente:

Ralph Gruppi Thomé

Endereço: Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400

Divinópolis, MG - Brasil

Telefone: +55 37 3221-1610

E-mail: ralph@ufsj.edu.br

Recebido em: 31/05/2016

Revisado em: 10/07/2016

Aceito em: 12/07/2016

Publicado em: 07/12/2016

Abstract

*The high rate of mitotic hematopoietic tissues provides a fast response to genotoxic exposure, assessed by chromosomal damage in blood cells. Herein, the goal was to biomonitor the waters of the Itapecerica River, in the city of Divinópolis, by frequency of micronuclei (MN), nuclear abnormalities (NA) in erythrocytes, besides the leukocytes count in peripheral blood of *Danio rerio*. The sampling sites had different environmental conditions: 1 in the city centre of Divinópolis (commercial and domestic sewage), 2 downstream of the city (area with preserved riparian vegetation), 3 stream tributary of the Itapecerica River (fluvial drainage and sewage) and 4 upstream of the city (reference site). The fish were purchased commercially and packed in four aquaria (n=5). Peripheral blood smears were obtained by puncture of the tail vein and stained with Giemsa. The MN frequency, nuclear abnormalities and leukocyte count were performed in light microscopy. The occurrence of these events and cell types was done per thousand erythrocytes. The highest values of MN, nuclear abnormalities and leukocytes were recorded in animals exposed to water from sites 1 and 3. There was statistically significant difference in the comparison between site 1 and sites 2 and 4 for all parameters studied. The results of this study permit us to infer the presence of genotoxic substances in the site 1 and allow warning the authorities contributing to the advancement of sanitation policies, since these actions are essential to translate the principle of sustainable development.*

Keywords: *Biomonitoring, environmental impact, fish, histology, micronucleus test*

Introdução

O rio Itapecerica nasce no Morro do Calado, município de Itapecerica, Minas Gerais, percorrendo, aproximadamente, 104 km até desaguar no rio Pará, no perímetro urbano de Divinópolis, Minas Gerais. O rio Pará, por sua vez, é um importante afluente do rio São Francisco¹. O abastecimento de água da cidade de Divinópolis é proveniente do rio Itapecerica, que percorre, aproximadamente, 18 km no perímetro urbano, possuindo uma vazão mínima de 0,5 m³/s (500 litros/segundo) no ponto de captação da Companhia de Saneamento de Minas Gerais – COPASA, a montante do centro da cidade². Atualmente, o rio Itapecerica apresenta elevado grau de poluição devido ao assoreamento, ocasionado pelo desmatamento indiscriminado da mata ciliar, associado com o despejo de dejetos químicos e orgânicos, muitas vezes sem prévio tratamento³.

Os peixes são excelentes modelos para o estudo do potencial mutagênico e carcinogênico dos poluentes presentes na água, uma vez que esses animais costumam responder à contaminação de uma maneira semelhante aos mamíferos, porém com reações rápidas, mesmo em baixas concentrações das substâncias tóxicas⁴. Atualmente, alguns biomarcadores fisiológicos e histopatológicos de peixes são extensivamente utilizados para documentar e quantificar os efeitos de poluentes ambientais nos ecossistemas aquáticos como, por exemplo, a frequência de micronúcleo (MN) em eritrócitos⁵⁻⁷, apoptose em células ovarianas⁸, além de alterações histológicas em brânquias e em fígado⁹. O *Danio rerio*, popularmente conhecido como “zebrafish”, peixe zebra ou paulistinha é um ciprinídeo originário da Ásia. Possui um pequeno

porte, é de fácil manuseio, resistente e tem características genéticas similares a dos mamíferos, tornando-se um dos mais importantes modelos de laboratório¹⁰.

Em peixes, a eritropoese acontece no baço e no rim cranial. Morfologicamente, os eritrócitos de teleosteos variam de ovais a elípticos, com núcleo central. Este pode ocupar até um quarto do volume da célula, e seu eixo longitudinal é paralelo ao da célula, exceto em algumas espécies, que possuem núcleo redondo. O citoplasma do eritrócito apresenta-se levemente eosinofílico, homogêneo, podendo conter quantidade variável de pontos claros rarefeitos ou vacúolos associados à degeneração de organelas celulares¹¹.

Durante a eritropoese, em alguns eritrócitos pode ocorrer a formação de micronúcleos que são pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina, separadas do núcleo principal da célula, formadas no processo de divisão celular, resultantes de fragmentos de cromossomos ou cromossomos acêntricos que não são incorporados ao núcleo de células filhas durante a anáfase da mitose. A análise de MN como um índice de dano genético acumulado durante a vida útil das células é uma das técnicas mais apropriadas para identificar a resposta integrada ou sinérgica decorrente da complexa mistura de componentes encontrada nos rios¹¹.

Além dos micronúcleos, outras anormalidades nucleares presentes nos eritrócitos dos peixes, tais como as células binucleadas, invaginadas e lobuladas também são consideradas biomarcadores citogenéticos de impacto ambiental, podendo ser

utilizadas numa análise complementar à frequência de micronúcleo. Essa correlação indica que as alterações nucleares podem ser respostas primárias, isto é, antes da formação de micronúcleos¹².

O grupo dos leucócitos compreende as células responsáveis pela defesa do organismo, e atua diretamente contra antígenos devidamente apresentados. Essas células utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou lesões teciduais. Os leucócitos compreendem diferentes linhagens celulares, e são diferenciados pela presença ou ausência de grânulos citoplasmáticos, assim como pelas suas características morfológicas e afinidade aos corantes histológicos. Linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos são os leucócitos comumente observados na circulação periférica dos peixes¹³. Peixes não possuem plaquetas e sim trombócitos, que são células relacionadas com processos de coagulação sanguínea, além de serem atuantes em infecções¹⁴. A variação do número de leucócitos circulantes pode ser atribuída a uma resposta generalizada do sistema imune, acionado por estresse fisiológico e consequente estado de saúde afetado. O aumento de leucócitos pode ser observado no início de um estresse na maioria das espécies de peixes, é considerado uma tentativa de recuperar a homeostase, enquanto que o decréscimo na contagem de leucócitos pode ser atribuído ao enfraquecimento do sistema imunológico¹⁵.

Dessa forma, o presente estudo tem como principal objetivo biomonitorar as águas do rio Itapecerica, no município de Divinópolis, através da frequência de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN) em eritrócitos além da contagem de leucócitos de sangue periférico de *Danio rerio*.

Metodologia

Amostragem e experimentação

No mês de agosto de 2014, foram coletadas amostras de água do rio Itapecerica, no município de Divinópolis, em quatro pontos: (1) no centro de Divinópolis (área comercial e de esgoto doméstico) (20°07'14''S; 44°52'42''W), (2) jusante da zona urbana do município (20°09'55''S, 44°87'03''W), (3) córrego afluente do rio Itapecerica (drenagem fluvial e esgoto doméstico) (20°15'74''S; 44°89'64''W) e (4) a montante da zona urbana do município (20°13'09''S; 44°54'51''W) escolhido como ponto de referência (FIGURA 1). A época era de baixa pluviosidade com média no mês de 34,3 mm¹⁵. Em cada ponto foram recolhidos 5 litros de água em recipiente adequado conduzidos e logo utilizados no ensaio experimental. Vinte exemplares adultos de *Danio rerio* obtidos comercialmente foram utilizados. Na primeira semana foi realizada a aclimação dos peixes em água proveniente da COPASA depois de ser decalcificada. O teste foi realizado utilizando-se quatro aquários (n=5) onde os peixes estavam

divididos de acordo com os pontos coletados. Os aquários tinham volume de três litros e foram mantidos em temperatura ambiente, oxigenação constante, fotoperíodo de 12/12 horas, e os peixes alimentados por duas vezes ao dia (FIGURA 2) durante 30 dias. Os aquários foram codificados para que o conhecimento prévio do ponto de coleta não influenciasse nas análises, assim estas foram realizadas às cegas por três avaliadores independentes. Não houve distinção entre machos e fêmeas para realização do presente trabalho (Aprovado pela Comissão de ética no uso de animais CEUA UFSJ/ nº 23/2012).

Distensões sanguíneas

As amostras de sangue periférico foram obtidas através de punção da veia caudal de *D. rerio*, ao final de 30 dias de exposição, utilizando seringa com anticoagulante (EDTA). Os animais foram anestesiados com 50mg/L de benzocaína. Em seguida, foram preparadas distensões sanguíneas em lâminas histológicas limpas e codificadas. As distensões foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. A coloração das distensões sanguíneas foi realizada pela técnica de Giemsa, seguindo o protocolo: o corante concentrado foi diluído na proporção de 2 gotas/mL de água tamponada, com pH entre 6,8 e 7,0. O tamponamento foi feito através da mistura de 50,8mL de KH₂PO₄ 0,15M (fosfato de potássio monobásico, peso molecular 136,09g/mol) a 49,2 mL de Na₂HPO₄ 0,15M (fosfato de sódio dibásico, peso molecular 141,96g/mol). As lâminas de distensão sanguínea foram imersas na solução tamponada de Giemsa por 20 minutos e depois lavadas em água corrente.

Para a análise de MN e anomalias nucleares, os eritrócitos foram examinados em microscópio de luz equipado com lente de imersão em óleo (ampliação de 1000x). Os MN foram identificados e quantificados para análise da frequência com que tal anomalia ocorre e para comparação entre os pontos do rio Itapecerica. Pequenas partículas ou corpos ovais intracitoplasmáticos de um tamanho entre 1/5 a 1/20 do núcleo principal, sem ponte de ligação e no mesmo plano óptico foram interpretados como MN. Células com mais de quatro micronúcleos foram descartadas para exclusão de fenômenos apoptóticos⁵. As anormalidades nucleares, como núcleos binucleados, lobulados e invaginados foram registradas separadamente e agrupadas em apenas uma classe, independentemente da forma. Para a contagem de MN e das anormalidades nucleares, foram utilizados 1000 eritrócitos por distensão sanguínea. A contagem diferenciada de leucócitos foi realizada utilizando 10 campos consecutivos em objetivo de 100 X e levou-se em consideração a morfologia nuclear e a coloração citoplasmática.

Análises estatísticas

As características morfológicas foram quantificadas e apresentadas como médias ± E.P.M.

(erro padrão da média). O método de Kolmogorov e Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. Para comparações entre diferentes grupos experimentais, foi realizado o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Todos os testes

estatísticos foram realizados utilizando o programa Graph Pad InStat versão 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Foram consideradas somente as diferenças em nível de 5% de significância ($p < 0,05$).



FIGURA 1: Fotos tiradas dos pontos no momento da coleta. Ponto 1 (A) no centro de Divinópolis (área comercial e de esgoto doméstico), ponto 2 (B) a jusante da cidade (área com vegetação marginal preservada), ponto 3 (C) córrego afluente do rio Itapecerica (drenagem fluvial e esgoto doméstico) e ponto 4 (D) a montante da cidade (ponto referência).



FIGURA 2. Aquários do experimento realizado. Os peixes comerciais foram expostos à água dos quatro pontos em análise, do Rio Itapecerica. O ensaio foi realizado às cegas através de codificação desconhecida pelos três avaliadores das distensões sanguíneas.

Resultados

Durante o período de realização do estudo, não foi registrada nenhuma morte e nem destacadas alterações comportamentais.

Através das distensões sanguíneas de *D. rerio* (FIGURA 3) observou-se a presença de eritrócitos normais com núcleo basófilo, em forma elíptica e citoplasma levemente eosinofílico (FIGURA 3A). O MN foi caracterizado como um pequeno corpo intracitoplasmático altamente basófilo e distinguível do núcleo, ambos no mesmo plano focal (FIGURA 3A). Em menor quantidade, foi observada a presença de leucócitos que foram classificados por sua

morfologia e coloração citoplasmática na distensão sanguínea (FIGURA 3B). Núcleos de eritrócitos que apresentaram projeções, invaginações, lobulação ou bilobulações foram quantificados, somados e foram considerados como anormalidades nucleares (FIGURA 3C e D).

Os maiores valores de ocorrência de micronúcleo e de anormalidades nucleares, assim como de leucócitos, foram registrados nos animais expostos à água proveniente dos pontos 1 e 3. Houve diferença estatística significativa na comparação entre o ponto 1 e os pontos 2 e 4 em relação a todos os parâmetros analisados (TABELA 1).

TABELA 1: Valores de ocorrência de micronúcleo, anormalidades nucleares e leucócitos em peixes expostos a água do Rio Itapeperica em diferentes pontos de amostragem.

GRUPO (N = 5)	Micronúcleo	Anormalidades nucleares	Leucócitos
1	2,8 ± 0,7 ^a	8,0 ± 4,7 ^a	25,8 ± 17,0 ^a
2	0,4 ± 0,4 ^b	4,2 ± 2,9 ^b	14,8 ± 11,2 ^b
3	1,0 ± 0,5 ^{ab}	6,3 ± 3,4 ^{ab}	35,3 ± 27,1 ^{ab}
4	0,5 ± 0,2 ^b	3,8 ± 3,8 ^b	16,5 ± 12,4 ^b

Dados hematológicos dos grupos de experimentação expressos em média ± erro padrão. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. ($p < 0,05$).

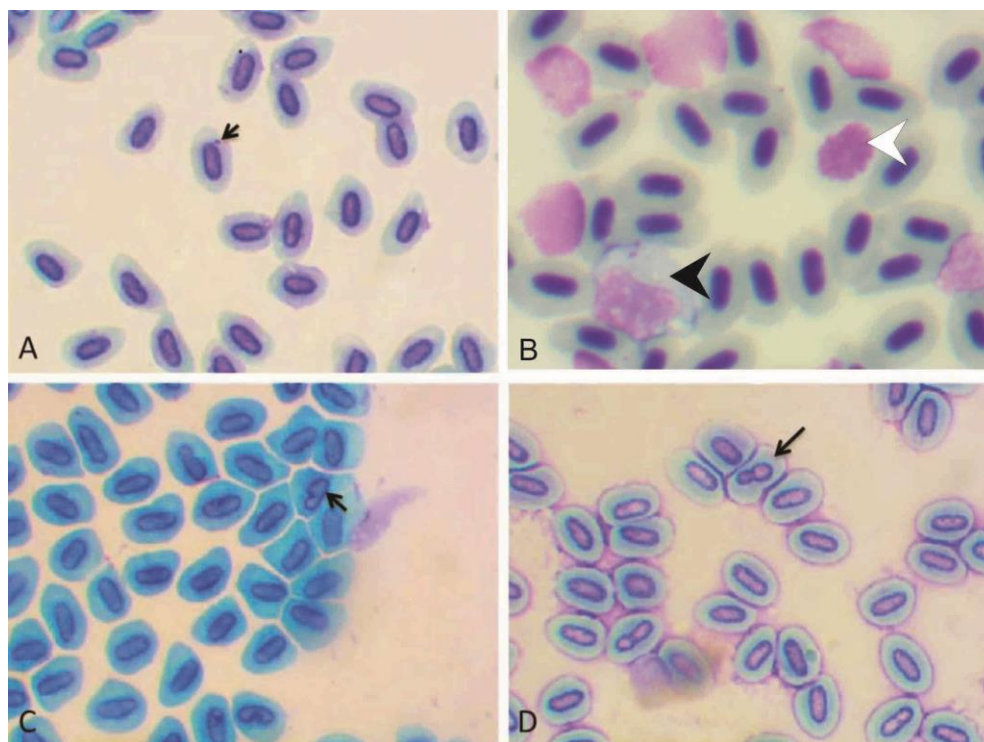


FIGURA 3: Distensão sanguínea de *D. rerio* corada com Giemsa. A – micronúcleo (seta curta) e vários eritrócitos normais ao redor; B – leucócitos: cabeça de seta preenchida mostra granulócito e cabeça de seta vazia apresenta trombócito; C – invaginações nucleares (seta longa); D – núcleo bilobulado (seta longa). Em todas as imagens a ampliação foi de 1000x.

Discussão

O município de Divinópolis é caracterizado pela marcante presença da indústria têxtil e mineradora¹⁶, as quais são grandes produtoras de resíduos com potencial efeito poluente sobre o ambiente aquático, como corantes e rejeitos de minério. Mundialmente, sabe-se que descargas industriais e urbanas são as maiores responsáveis pelas elevadas concentrações de contaminantes tóxicos em ambientes aquáticos⁷. Dessa maneira, não é possível negligenciar o impacto ambiental da atividade antrópica intensa sobre o rio, que exerce dupla função de fornecimento de água e local de descarga de efluentes. Os pontos relacionados com a maior frequência de micronúcleo, anormalidades nucleares e de leucócitos foram o ponto 1, no centro de Divinópolis, e o ponto 3, no córrego afluente do rio Itapecerica.

No presente trabalho, os animais expostos à água coletada de diferentes pontos do rio Itapecerica apresentaram frequências de MN com valores médios variando de 0,4 a 2,75 por 1000 eritrócitos. A análise da frequência de micronúcleos foi relatada por diferentes autores e mostra uma grande variabilidade entre espécies, variando de 0 a 13 MN por 1000 células. A ocorrência de micronúcleos por origem endógena é amplamente relatada e não ultrapassa valores iguais a 1 micronúcleo por 1000 células^{7,12,17}. De fato, os micronúcleos aparecem devido a uma quebra cromossômica ou de disfunções dos fusos mitóticos e eventualmente pode ser normal, mas o aumento da frequência é indubitavelmente influenciado pela exposição a substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas⁵, sendo assim um claro sinal de perturbação no ambiente^{7,18,19}. Nesse sentido, os valores obtidos nos pontos 2 e 4 indicam uma situação normal e os valores obtidos em 1 e 3, principalmente em 1, proporcionam um alerta de contaminação no local.

Já as anormalidades nucleares podem ser explicadas devido a uma ação de reparo da célula ao se detectar uma região cromossômica afetada iniciando um processo de reparação e ou eliminação. Assim, antes da eliminação completa da região afetada, a membrana nuclear apresenta imperfeições, que caracterizam essas anormalidades nucleares²⁰. De acordo com Seriani e colaboradores (2011), outro indício pode ser a evidência de estresse oxidativo induzido por um poluente disperso no ambiente. Isso porque no estresse oxidativo as membranas podem ter a sua permeabilidade e seletividade alterada pela peroxidação lipídica, tornando o núcleo mais sensível a deformações e alterações. No presente estudo, altos valores de anormalidades nucleares foram observados em animais expostos à água coletada nos pontos 1 e 3, acompanhando os achados de micronúcleo. No entanto, devido à ausência de conhecimento sobre a formação dessas anormalidades, as alterações nucleares têm sido utilizadas apenas como informação complementar, deixando para a os

micronúcleos o título de melhores biomarcadores de poluição no ambiente^{7,21}.

No presente estudo, obteve-se diferença significativa da frequência de leucócitos no sangue periférico de *D. rerio* em dois dos quatro pontos analisados. De uma forma geral, os peixes possuem os mesmos tipos de leucócitos encontrados nos demais vertebrados, compreendendo os granulocíticos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos; e os agranulocíticos: linfócitos e monócitos. Essas células apresentam funções diversas na defesa do organismo contra agentes infecciosos e a poluentes.

Assim, a leucocitose observada nos animais expostos à água coletada nos pontos 1 e 3 também indica um grande estresse ambiental nestes trechos de estudo. Resultados semelhantes foram observados em animais expostos à água superficial do Rio Tietê²² e expostos a contaminantes individuais ou a misturas complexas²³⁻²⁵. No mesmo sentido, porém com análise de contaminação a partir de sedimentos do rio Tietê, embriões de *D. rerio* apresentaram defeitos como coagulação, edemas e retardo de desenvolvimento, todos associados a problemas na circulação de sangue periférico²⁶.

Os animais submetidos à água coletada no ponto a jusante da cidade, em todos os parâmetros avaliados, apresentaram valores próximos daqueles encontrados no ponto referência, indicando que as substâncias genotóxicas não foram carregadas ou não tiveram aumento da concentração ao longo da passagem do rio pelo perímetro urbano de Divinópolis. De fato, rios, assim como, outros sistemas aquáticos, possuem capacidade de restabelecer suas características naturais após a entrada de efluentes, uma vez que apresentam alto potencial de autopurificação²⁷. Essa autopurificação tem base na capacidade de assimilação de compostos orgânicos e inorgânicos e está relacionada com processos que envolvem modificações biológicas, químicas e físicas simultâneas²⁸. Características como velocidade do curso d'água, profundidade média do rio, concentração de oxigênio dissolvido na água e vazão influenciam diretamente nesse fenômeno de autopurificação²⁹. Von Sperling (2005) propõe a segmentação do rio em zonas de autopurificação, que variam de águas limpas anteriores ao ponto de descarga, no ponto de descarga, uma zona de recuperação logo após, prevalecendo à introdução de oxigênio dissolvido no meio aquático e por fim têm-se novamente a zona de águas limpas.

O presente estudo fornece dados inéditos de pesquisa pela presença de substâncias genotóxicas nas águas do Rio Itapecerica, no município de Divinópolis, pela análise da frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *D. rerio*. Além disso, confirma a utilização de micronúcleos como bons biomarcadores, evidenciando as grandes vantagens

do biomonitoramento sobre a pesquisa direta por substâncias químicas no ambiente. O biomonitoramento permite avaliar poluentes biológicos disponíveis em escala realista, integrar efeitos múltiplos e auxiliar na elucidação de seus mecanismos de ação³⁰. Os biomarcadores como micronúcleos e anormalidades nucleares oferecem vários tipos de informações exclusivas que não estão disponíveis a partir de outros métodos como: (1) alerta precoce de danos ambientais; (2) o efeito integrado de uma variedade de estresses ambientais sobre a saúde de um organismo e da população, comunidade e ecossistema; (3) as relações entre as respostas individuais dos organismos expostos à poluição e os efeitos ao nível da população; (4) alerta precoce de potenciais danos para a saúde humana com base nas respostas de animais selvagens à poluição; e (5) a eficácia dos esforços de remediação em descontaminar ambientes aquáticos^{6,11,31}.

Conclusão

Há presença de substâncias genotóxicas no Rio Itapeçerica, e há maior quantidade desses contaminantes no trecho mais antropomorfizado. Os resultados indicam que não ocorre carreamento dessas substâncias ao longo do Rio e nem aumento de concentração, visto que, no ponto a jusante os resultados foram semelhantes ao ponto referência. Essas informações permitem um melhor entendimento das áreas críticas que devem receber maior atenção dos agentes governamentais com ações de controle de poluição, revitalização e saneamento.

Declaração de conflitos de interesses

Os autores do artigo afirmam que não houve nenhuma situação de conflito de interesse, tais como propostas de financiamento, emissão de pareceres, promoções ou participação em comitês consultivos ou diretivos, entre outras, que pudessem influenciar no desenvolvimento do trabalho.

Agradecimentos

Os autores são gratos à UFSJ/CNPq pela bolsa de iniciação científica e à FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

- 1- GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P. Breve visão do São Francisco, pp. 15-24. In: H. P. GODINHO e A. L. GODINHO (Eds). **Águas, peixes e pescas no São Francisco das Minas Gerais**. CNPq/PADCT, Editora PUC-Minas, Belo Horizonte, MG, 460p. 2003.
- 2- COPASA. **Plano Diretor de abastecimento de água de Divinópolis-MG**, 1995.
- 3- MENEZES, H.C.; FARIA, A. G. Utilizando o monitoramento ambiental para o ensino da química.

Pedagogia de projetos. **Química Nova**, v. 26, p. 287-290, 2003.

4- OBIAKOR, M.O.; OKONKWO, J.C.; NNABUDE, P.C.; EZEONYEJIA, C.D.. Eco-genotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution biomarker: a review. **Journal of Animal Science Advances** v. 2, n. 1, p. 123-133, 2012.

5- BOLOGNESI, C., PERRONE, E., ROGGIERI, P., PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**. v. 78, p. 93-98, 2006.

6- MANZANO B.C.; ROBERTO, M.M.; HOSHINA, M.M.; MENEGÁRIO, A.A; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollutant Research**, v. 22, p.1399-1407, 2015.

7- HUSSAIN, B., SULTANA, T., SULTANA, S., MAHBOOB, S., AL-GHANIM, K. A., & NADEEM, S. Variation in genotoxic susceptibility and biomarker responses in *Cirrhinus mrigala* and *Catla catla* from different ecological niches of the Chenab River. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2016.

8- THOMÉ, R.G.; DOMINGOS, F.F.T.; SANTOS, H.B.; MARTINELLI, P.M.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. **Tissue and Cell**. v. 44, p. 54-62, 2012.

9- CHOUDHURY, M.G; SAHA, N.. Influence of environmental ammonia on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in the freshwater air-breathing catfish (*Heteropneustes fossilis*). **Aquatic Toxicology**. v. 116- 117, p. 43-53, 2012.

10- BARBAZUK, W.B.; KORF, I.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J.A.; MCPHERSON, J.D.; JOHNSON, S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome research**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000.

11- BOLOGNESI, C., HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v.26, p. 205-2013, 2011.

12- SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. AND NAPOLEÃO, S.R. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2011.

13- SILVA, A.S.E.; DE LIMA, J.T.X.; BLANCO, B.S. Hematologia em peixes (revisão bibliográfica). **Revista Centauro** v.3, n.1, p24 - 32, 2012.

14- PEREIRA, B.F.; ALVES, R.M.S.; PITOL, D.L.; ROCHA, R.C.G.A.; CAETANO, F.H. Effects of exposition to polluted environments on blood cells of the fish *Prochilodus lineatus*. **Microscopy Research And Technique** v. 75, p. 571-575, 2012.

15- Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>> acesso em setembro de 2014.

16- FERNANDES, L.M.; DAVID, S.; LOZIANE, R.D; LOPES, E.A. O perfil socioeconômico dos municípios que

compõem a microrregião de Divinópolis -Minas Gerais. **Revista da FACED (Impresso)**, v. 3, p. 52-60, 2005.

17- LEMOS, C.T.; RODEL, P.M.; TERRA, N.R.; OLIVEIRA, N.C.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 66, p. 391-401, 2007.

18- RAMÍREZ, O. A. B.; GARCÍA, F. P. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 291-295, 2005.

19- ENDRES JÚNIOR, D.; SASAMORI, M.H.; CASSANEGO, M.B.B.; DROSTE, A. Biomonitoring of water genotoxicity in a Conservation Unit in the Sinos River Basin, Southern Brazil, using the *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 91-97, 2015.

20- SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S-phase. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 6, p. 1307-1320, 1998.

21- 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**, v. 32, n. 2, p. 394-398, 2009.

22- SERIANI, R.; ABESSA, D.M.S.; MOREIRA, L.B.; CABRERA, J.P.G.; SANCHES, J.Q.; SILVA, C.L.S.; AMORIM, F.A.; RIVERO, D.H.R.F.; SILVA, F.L.; FITORRA, L.S.; CARVALHO-OLIVEIRA, R.; MACCHIONE, M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. In vitro mucus transportability, cytogenotoxicity, and hematological changes as non-destructive physiological biomarkers in fish chronically exposed to metals. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 112, p. 162-168, 2015.

23- ZUTSHI, B.; PRASAD, S.R.; NAGARAJA, R. Alteration in hematology of *Labeo rohita* under stress of pollution from Lakes of Bangalore, Karnataka, India. **Environmental Monitoring Assess**, v. 168, p. 11-19, 2010.

24- SERIANI, R.; ABESSA, D.M.D.S.; PEREIRA, C.D.; KIRSCHBAUM, A.A.; ASSUNÇÃO, A.; RANZANI-

PAIVA, M.J.T. Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, n. 2, p. 105-111, 2013.

25- PRADO, L.R.; FELIX, C.; ABESSA, D.M.; BURUAEM, L.M.; ABUJAMARA, L.D.; KIRSCHBAUM-TURATTI, G.C.R.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; CORREIA, A.T.; SERIANI, R. Hematological parameters and nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of *Achiruslineatus* (Pleuronectiformes: Achiridae). **Comparative Clinical Pathology**, v. 361, p. 1-7, 2014.

26- ROCHA, P.S.; BERNECKER, C.; STRECKER, R.; MARIANI, C.F.; POMPÊO, M.L.M.; STORCH, V.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicological and Environment Safety**, v. 74, p. 1951-1959, 2011.

27- VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v. 1. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3º ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, v. 1. p 452, 2005.

28- HAN, T.; ZHANG, H.; HU, W.; DENG, J.; LI, Q.; ZHU, G. Research on self-purification capacity of Lake Taihu. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 11, p. 8201-8215, 2015.

29- PALMA-SILVA, G.M.; TAUK-TORNISIELO, S.M.; PIÃO, A.C. Capacidade de autodepuração de um trecho do rio Corumbataí, SP, Brasil. **HOLOS Environment**, v.1, n. 2, p. 139-153, 2007.

30- SMITAL, T.; AHEL, M. Ecotoxicological characterization of the Sava River: Biomarker responses and biological assays. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v. 30, p. 177-200, 2014.

31- VILLELA, I.V.; DE OLIVEIRA, I. M.; DA SILVA, J.; HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n. 1, p. 78-86, 2006.