

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**O TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E O PIRARUCU  
(*Arapaima gigas*) COMO ORGANISMOS BIOINDICADORES  
DO EFEITO GENOTÓXICO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA  
(UVA e UVB)**

ALINE APARECIDA GROFF

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques

Co-orientador: Dr. Adalberto Luís Val

Porto Alegre (RS)

2008

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Este projeto contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer as pessoas que compreenderam a minha ausência nestes vários meses de trabalho, apoiando-me e me transmitindo carinho mesmo que às vezes de tão longe; Lair e Vanilda, meus pais, Grazi e Júnior, meus irmãos, meus amados sobrinhos Mauricio e Mariana e meu namorado, Fabio, fizeram nascer, com isso, um vínculo maior e uma forte valorização da nossa convivência. Amo muito vocês!!!

Ao meu orientador Dr. João Antônio Pêgas Henriques, por acreditar no meu trabalho, pela orientação e conhecimentos valiosos que me fizeram crescer profissional e pessoalmente.

Ao meu co-orientador Dr. Adalberto Luís Val, pela orientação, pelas suas sugestões e críticas a este trabalho, todas elas foram de grande valia para realizá-lo.

À minha querida, Dra. Juliana da Silva, que mais que uma colaboradora participou ativamente neste trabalho com toda a sua sabedoria. Muito obrigada por todas as orientações desde a iniciação científica. Ju, espero poder ser sua amiga e realizar muitos trabalhos ainda com você!!!!

Não posso deixar de agradecer a minha Comissão de Acompanhamento, Dr. Jaqueline Nascimento Picada e a Dr. Jenifer Saffi, por suas sugestões e críticas a este trabalho.

À Dra. Vera Maria Fonseca Almeida e Val, pelo apoio e pela atenção dada no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular – LEEM.

Ao Dr. Arthur Germano Fett Neto, pelas importantes sugestões durante a revisão deste trabalho.

À banca examinadora, Dra. Vera Maria Fonseca Almeida e Val, Dr. Bernardo Erdtmann e Dr. Arthur Germano Fett Neto pela disposição em avaliar este trabalho.

À todos os amigos do LEEM: Adriana, Suely, Rozi, Luciana Pinto, Rubens, Vivian, Luiza, Thiago, Katherine, Ana, Alzira, Helio, Rafael, Luciana, Carol, Sandra, Iuri, Marcio, pelas alegres horas de ajuda e convivência durante todo o período experimental e, em especial, Christiane e Nivia, que me acolheram em suas casas, foi muito bom conhecer vocês, espero sempre tê-las como amiga.

À Dona Sonia pelos cafezinhos, tapiocas, brigadeiros durante as poucas horas de folga no laboratório.

À Nazaré, Angélica e Raquel pela ajuda na aquisição de materiais para execução dos experimentos no LEEM, meu muito obrigada.

À minha família de Manaus, Dona Patria, Sonia, Ninito, Suanam, Suelem, Jacinto pelos alegres almoços de domingo que me ajudaram a suportar as saudades, adoro todos vocês!!!

Aos amigos do Laboratório de Genética Toxicológica da Ulbra, Vinícius, Fernandinha, Valeria, Pedro e em especial Martus e Mila, pela ajuda com a análise do Teste de Micronúcleos.

À Silvia e ao Luciano, da Secretaria do PPGBCM, sempre muito atenciosos, prontos para nos tirar todas duvidas, obrigado pelo carinho!

Enfim, agradeço a todas as pessoas que ajudaram de maneira direta ou indireta na realização e concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	3
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Radiação Ultravioleta.....	13
1.2 Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre os Seres Vivos .....	16
1.3 Peixes como Bioindicadores .....	21
1.4 Organismos Bioindicadores .....	23
1.4.1 <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1818).....	23
1.4.2 <i>Arapaima gigas</i> (Cuvier, 1829).....	25
1.5 Biomarcadores deste Estudo .....	26
1.5.1 Ensaio Cometa.....	28
1.5.2 Teste de Micronúcleos .....	30
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3. ARTIGO A SER SUBMETIDO A AQUATIC TOXICOLOGY: UVA/UVB- Induced Lesion Repair and Genotoxicity in the Amazonian Fishes <i>Colossoma macropomum</i> and <i>Arapaima gigas</i></b> .....	33
Abstract .....	35

1. Introduction .....	36
2. Materials and Methods .....	38
2.1 Animals .....	38
2.2 Experimental Design and Sampling.....	38
2.3 Genotoxic Assay .....	40
2.3.1 Comet Assay .....	40
2.3.2 The Micronucleus Test.....	41
2.4 Hemoglobin Values.....	41
2.5 Statistical Analysis .....	41
3. Results .....	42
4. Discussion .....	51
5. Acknowledgments.....	56
6. References .....	56
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>Figura 1:</b> Espectro eletromagnético solar que atinge a superfície terrestre.....	13
<b>Figura 2.</b> Espectro eletromagnético.....	14
<b>Figura 3.</b> Medida de Intensidade da radiação ultravioleta.....	15
<b>Figura 4.</b> Exemplar de <i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui).....	24
<b>Figura 5.</b> Exemplar de <i>Arapaima gigas</i> (pirarucu).....	25
<b>Figura 6.</b> Ensaio Cometa: eritrócitos de peixes expostos a radiação ultravioleta, corados com nitrato de prata mostrando as diferentes classes, sem danos – classe 0 até danos máximos – classe 4 .....	29
<b>Figura 7.</b> Micronúcleo de esfregaço sanguíneo de peixe: (A) célula normal e (B) célula com micronúcleo .....	31
<b>3. ARTIGO A SER SUBMETIDO A AQUATIC TOXICOLOGY: UVA/UVB-Induced Lesion Repair and Genotoxicity in the Amazonian Fishes <i>Colossoma macropomum</i> and <i>Arapaima gigas</i></b> .....	33
<b>Figure 1.</b> Procedure of exposure (0.5, 1, 2 and 4 hours of UV exposition) and sampling of blood for tambaqui (both under normoxia and hypoxia condition) (A-D) and pirarucu (D). * Sampling at 12h, 24h, and 48h after the exposure periods.....	39
<b>Figure 2.</b> Comparison between Comet assay (A) and MN test (B) results (means and standard deviations) of tambaqui and pirarucu exposed to ultraviolet radiation for 4h, sampling at 12h after the exposure. ** Significant at P<0.01, * Significant at P<0.05; ANOVA, Dunnett’s test.....	47

**Figure 3.** Distribution of damaged cells in Comet assay into damage classes. (A) tambaqui under normoxia; (B) tambaqui under hypoxia; (C) pirarucu. The percentage of cells in each class was calculated based on 100 cells per fish.....48

**Figure 4.** Damage Index means and standard deviations (Comet assay) of different sampling schedules after the completion of UV exposure for 4h (repair). (A) tambaqui under normoxia; (B) tambaqui under hypoxia; (C) pirarucu. <sup>a</sup>Significant at P<0.01 in relation to the control group of same group; <sup>b</sup>Significant at P<0.01 in relation to UV 12h; <sup>c</sup>Significant at P<0.01 in relation to Control 12h; <sup>d</sup>Significant at P<0.01 in relation to UV 24h; <sup>e</sup>Significant at P<0.01 in relation to control 24h; ANOVA, Dunnet’s test.....49

**Figure 5.** Micronucleated cell means and standard deviations of different sampling times after completion of 4h UV exposure (repair). (A) tambaqui under normoxia; (B) tambaqui under hypoxia; (C) pirarucu. <sup>a</sup>Significant at P<0.01 in relation to the control group of same group; <sup>b</sup>Significant at P<0.01 in relation to UV 12h; <sup>c</sup>Significant at P<0.01 in relation to Control 12h; <sup>d</sup>Significant at P<0.01 in relation to UV 24h; <sup>e</sup>Significant at P<0.01 in relation to control 24h; ANOVA, Dunnet’s test.....50

**Figure 6.** Mean hemoglobin values of tambaqui under normoxia and hypoxia, and pirarucu. \* P<0.05, *t*-Student.....51



## LISTA DE TABELAS

<b>3. ARTIGO A SER SUBMETIDO A AQUATIC TOXICOLOGY: UVA/UVB-Induced Lesion Repair and Genotoxicity in the Amazonian Fishes <i>Colossoma macropomum</i> and <i>Arapaima gigas</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>TABLE I.</b> Detection of DNA erythrocyte damage in <i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui) exposed <i>in vivo</i> to ultraviolet radiation (UV) for different exposure times, sampling at 12h after the exposure.....	<b>44</b>
<b>TABLE II.</b> Mean values of Micronucleated Cells (MN) observed in the erythrocytes of <i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui) exposed <i>in vivo</i> to UVR for different exposure times, sampling at 12h after the exposure.....	<b>45</b>
<b>TABLE III.</b> Detection of DNA Damage and Micronucleated Cells (MN) (mean $\pm$ standard deviation) in the Erythrocytes of <i>Arapaima gigas</i> (pirarucu) exposed <i>in vivo</i> to ultraviolet radiation (UV) for 4h, sampling at 12h after the exposure.....	<b>46</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BER	- Reparo por Excisão de Bases
CPDs	- Dímeros de Pirimidina Ciclobutano
C-5	- Carbono 5
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
EC	- Ensaio Cometa
EPC	- Eritrócitos Policromáticos
EROs	- Espécies Reativas de Oxigênio
ENC	- Normocromáticos
HGPRT	- Hipoxantina-guanina phosphoribosil-transferase
IUV	- Índice Ultravioleta
INPE	- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
MMS	- Metil Metanosulfonato
nm	- Nanômetro
MN	- Micronúcleos
NER	- Reparo por Excisão de Nucleotídeos
PAHs	- Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PCB	- Bifenil Policlorado
RNA	- Ácido Ribonucléico
SCGE	- Single Cell Gell Electrophoresis
UV	- Ultravioleta

## RESUMO

A radiação ultravioleta (UV) é uma pequena porção da radiação total recebida do sol. É subdividida em UVA (entre 315 e 400nm), UVB (entre 280 e 315nm) e UVC (entre 100 e 280nm). Segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), a intensidade de radiação UV depende de uma série de elementos, entre eles posição geográfica; quanto mais próximo do Equador, maiores serão os níveis de radiação ultravioleta. Assim, a Amazônia, por estar localizada na região equatorial, recebe uma maior quantidade de radiação UV do que regiões temperadas e polares. Ações do homem na Amazônia, como o desmatamento e as queimadas fazem com que os corpos d'água fiquem mais expostos a esse tipo de radiação. A penetração da radiação UV na água está relacionada à quantidade de material sobre a água e à quantidade de carbono orgânico dissolvido na mesma. Desta maneira, animais que vivem em ambientes oligotróficos, águas claras, com baixa profundidade, baixa concentração de oxigênio dissolvido e, ainda, quando vêm até a superfície respirar, tornam-se mais vulneráveis à radiação UV. *Colossoma macropomum* (tambaqui) quando em hipóxia, pratica respiração na camada superficial da coluna d'água e o *Arapaima gigas* (pirarucu) possui respiração aérea obrigatória, que o obriga a vir à superfície em intervalos regulares para respirar oxigênio atmosférico, ficando assim mais expostos à radiação UV. Esse estudo avaliou o efeito genotóxico e mutagênico da radiação UV por meio do Ensaio Cometa (EC) e Micronúcleo (MN) em exemplares de tambaqui e pirarucu jovens. Tambaquis foram expostos a diferentes doses de radiação UVA e UVB por diferentes tempos, com o objetivo de avaliar a sensibilidade desta espécie; os exemplares de pirarucu foram expostos somente por 4h (120,96 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259,20 J/cm<sup>2</sup> UVB). As radiações UVA e UVB induzem principalmente dímeros de timina no DNA, assim como geram danos oxidativos. Nosso estudo demonstrou que a radiação UV causou genotoxicidade pela análise de danos ao DNA detectada pelo EC em ambas as espécies de peixes. Foi observada dose resposta para o tambaqui, sendo que quanto maiores as doses e quanto maior foi o tempo de exposição, maior o dano ao DNA. Nossos resultados em relação às classes de danos do EC mostraram que, quanto maior o tempo de exposição à radiação UV, mais danos classe 4 foram observados para ambas as espécies. Os danos tipo 4 detectados

foram de 18% e 31% para os eritrócitos de tambaqui, normóxia e hipóxia, respectivamente, e 11% para os eritrócitos de pirarucu. A classe 4 de danos apresenta associação com as lesões do tipo quebra de cadeia dupla de DNA. Quando comparadas as condições de hipóxia e normóxia do tambaqui, hipóxia demonstrou causar maiores índices de danos ao DNA. Para o MN, somente a dose máxima (120,96 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259,20 J/cm<sup>2</sup> UVB) de radiação UV induziu mutagenicidade no tambaqui tanto em normóxia como em hipóxia em relação ao grupo controle. Foi observado uma redução de cerca de três vezes dos danos de DNA (EC) após ter cessado a exposição a UV por 24h, demonstrando reparo celular. Quando comparadas às espécies entre si, o tambaqui teve um nível basal de danos para ambos os testes, Ensaio Cometa e Micronúcleo, maior do que o pirarucu, mostrando que o pirarucu está mais adaptado a este tipo de genotoxicidade, possivelmente pelo seu histórico evolutivo. Os resultados nos levaram a concluir que o Ensaio Cometa e o Teste de Micronúcleos se complementam para o estudo em questão, acarretando uma classificação de diferentes "*end points*" de avaliação genotóxica, e ressaltando a importância de manter uma combinação de testes para melhor discernimento da mutagenicidade e genotoxicidade causada pela exposição à radiação UV. Finalmente, o tambaqui e o pirarucu revelaram sensibilidade suficiente para tornarem-se monitores efetivos de riscos biológicos na região Amazônica.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A radiação solar esteve e está presente durante a evolução dos organismos. Uma parte destes organismos já está adaptada a certos comprimentos de onda do espectro solar que atinge a superfície terrestre, mesmo considerando os efeitos adversos de parte da radiação solar. Mudanças na composição da atmosfera terrestre (presença de poluentes, CO<sub>2</sub>, ozônio, etc.) resultam em alterações do espectro solar que atinge o solo, incluindo a radiação ultravioleta (WINCKLER & FIDHIANY, 1996).

Durante os últimos vinte anos, foi observada uma redução gradual da espessura da camada de ozônio, principalmente nas latitudes médias e altas, atribuída a compostos químicos resultantes das atividades humanas. Esta redução aumenta em regra geral, na direção dos pólos e com maior intensidade no chamado buraco de Ozônio da Antártica (MAIA & FRANÇA, 2003). Isto quer dizer que, com a diminuição da proteção proporcionada pelo ozônio, a superfície terrestre, incluindo os corpos d'água, fica mais vulnerável à ação da radiação ultravioleta. Segundo estudos divulgados nos últimos meses, a temperatura global subirá até três graus Celsius até 2100, devido a emissões de gases do efeito estufa (WILLIAMS, *et al.*, 2007).

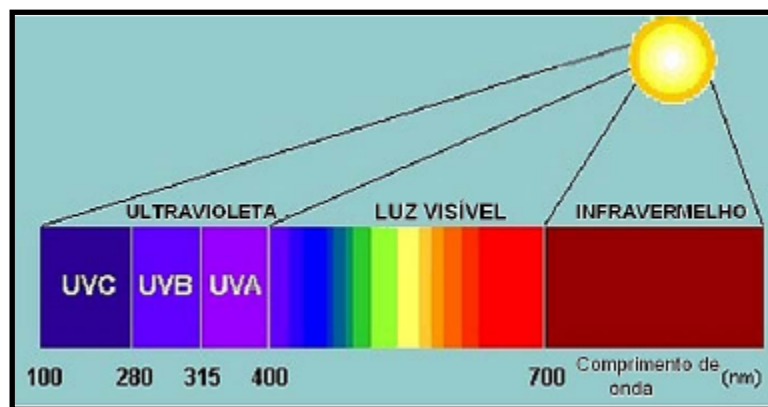
O sol emite uma ampla faixa de radiação eletromagnética, sendo que os comprimentos de onda de maior interesse ecológico abrangem as faixas do ultravioleta, do visível e do infravermelho (ESTEVES, 1998) (Figura 1).



**Figura 1.** Espectro eletromagnético solar que atinge a superfície terrestre (CAPELLA, 2003).

A radiação UV é apenas uma pequena parte do espectro solar: seu valor corresponde a 8,7% da radiação emitida pelo sol e localiza-se entre os comprimentos de ondas de 100 e 400nm do espectro eletromagnético (CALDWELL *et al.*, 2003). Em 1932, foi recomendado por várias instituições internacionais, entre elas a Commission Internationale de l'Éclairage (CIE), que o espectro ultravioleta fosse dividido em três subregiões: UVA entre 315 e 400nm, UVB entre 280 e 315nm e UVC entre 100 e 280nm (Figura 2).

A radiação UVC corresponde a cerca de 1% da emissão solar e não atinge a superfície terrestre devido à forte absorção pelo oxigênio (O<sub>2</sub>) e pelo ozônio (O<sub>3</sub>) estratosférico. A radiação UVB é mais energética, corresponde a 1,5% da energia total do sol, tendo o maior efeito biológico na superfície terrestre. A radiação UVB é fortemente absorvida pelo O<sub>3</sub> estratosférico, mas uma parcela significativa ainda atinge a superfície terrestre. Por fim, tem-se a radiação UVA, que compreende aproximadamente 6,3% da emissão da energia total do Sol. A absorção pela atmosfera é muito fraca e, em consequência, a maior parte da radiação atinge o solo (FREDERICK & LUBIN, 1994).



**Figura 2.** Espectro eletromagnético (Agência de Proteção contra Radiação do Governo Australiano, 1999).

Na faixa de 280 a 315nm, a intensidade de radiação cresce rapidamente, apresentando, portanto, uma intensidade maior em 315nm do que em 280nm. No entanto, a sensibilidade biológica se comporta ao contrário, isto é, ela é maior em 280nm, decrescendo rapidamente para o lado de 315nm. É esta variação da sensibilidade biológica que é chamada de espectro de

ação, ou espectro de sensibilidade biológica. O espectro de ação, faixa UVB, é que interfere nos sistemas biológicos causando desequilíbrios (KIRCHHOFF, 2003).

O Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) utiliza uma medida de intensidade da radiação ultravioleta (índice ultravioleta – IUV) de risco para os seres vivos. O IUV é apresentado como um número inteiro. De acordo com recomendações da Organização Mundial da Saúde, esses valores são agrupados em categorias de intensidades, conforme observado na Figura 3.

<b>CATEGORIA</b>	<b>ÍNDICE ULTRAVIOLETA</b>
<b>BAIXO</b>	<b>Menor que 2</b>
<b>MODERADO</b>	<b>3 a 5</b>
<b>ALTO</b>	<b>6 a 7</b>
<b>MUITO ALTO</b>	<b>8 a 10</b>
<b>EXTREMO</b>	<b>Maior que 11</b>

**Figura 3.** Medida de Intensidade da radiação ultravioleta (INPE, 2006).

Segundo o INPE, a intensidade da radiação ultravioleta depende de uma série de elementos, como concentração de ozônio, altitude, hora do dia, estação do ano, condições atmosféricas, tipo de superfície e posição geográfica da localidade. Quanto mais próximo do Equador, maiores serão os níveis de radiação ultravioleta. Assim, a Amazônia, por estar localizada na região equatorial, recebe uma maior quantidade de radiação UV do que regiões temperadas e polares.

Ao atravessar a atmosfera terrestre, parte da radiação solar é absorvida ou refletida nas partículas de poeira, gases e vapor d'água, resultando em uma radiação chamada difusa. Deste modo, sobre a superfície da terra incide uma radiação direta e uma radiação difusa, e as porcentagens de cada uma delas dependem principalmente da composição da atmosfera. Na superfície dos corpos d'água, portanto, chegam a radiação que incide diretamente e a radiação difusa da atmosfera. A primeira constitui-se na principal fonte de energia para os ecossistemas

aquáticos continentais, embora a radiação difusa possa variar de 8 a 100% da radiação total, dependendo da nebulosidade e da posição relativa do sol. Ao penetrar na coluna d'água, a radiação UV é submetida a profundas alterações, tanto na sua intensidade quanto na qualidade espectral. Estas alterações dependem de vários fatores; dentre eles destacam-se a concentração de material dissolvido e a concentração de material em suspensão (ESTEVES, 1998).

Quando atinge a superfície, a radiação UV exerce diversos tipos de efeitos sobre os seres vivos. Dentre esses efeitos, podem ser destacados a atenuação do crescimento de lavouras e frutos (CALDWELL *et al.*, 2003), a diminuição da produção de fitoplâncton (HÄDER *et al.*, 2003), os cânceres e mutações genéticas em peixes e anfíbios (TIEGTE *et al.*, 2001).

A luz UV foi inicialmente caracterizada por J. W. Ritter em 1801 e, em 1877, tem-se o primeiro relato de morte de bactérias por luz solar devida aos comprimentos de onda mais curtos da luz UV (KOLLER, 1952). Vale ressaltar que neste período da história humana, a natureza do material genético ainda não era conhecida.

## **1.2 EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA SOBRE OS SERES VIVOS**

A radiação UV, além de exercer efeitos benéficos e essenciais à vida, como a síntese de vitamina D3, fundamental para as funções osteoblástica e paratireóides, favorecer a circulação sanguínea, e atuar no tratamento de algumas dermatoses (WEBB & HOLICK, 1988), produz efeitos biológicos indesejáveis.

O efeito biológico da radiação UV é dependente do comprimento de onda (PARISI & WONG, 2000; SALO *et al.*, 2000; UPTON, 2000) e pode ser classificado em cinco categorias: (1) efeito sobre as moléculas do citoplasma; (2) efeito sobre o núcleo; (3) efeito sobre o tecido; (4) efeito sobre o organismo; e (5) efeito sobre o ecossistema. Os maiores efeitos da radiação UV ocorrem em nível molecular e incluem: (1) alterações dos receptores de membrana e moléculas do citoplasma (SCHWARTS, 1998; ANWAR & MOUSTAFA, 2001; ARMSTRONG *et al.*, 2002); (2) modificações no DNA e fatores de transcrição no nível celular (KAWEEWAT & HOFER, 1997; SOMOSY, 2000); (3) mudanças funcionais e morfológicas, no nível tecidual (PENNEYS & LAGUETTE, 1998); (4) imunossupressão,



câncer de pele, disfunções fisiológicas e bioquímicas, no nível do organismo (SALO *et al.*, 2000); e, por fim, (5) no nível de ecossistema, modificação da cadeia alimentar (CALDWELL *et al.*, 1998; HÄDER *et al.*, 1998; ROZEMA *et al.*, 2002).

Alguns efeitos merecem destaque, como o efeito molecular. As radiações UV não são capazes de ejetarem os elétrons da camada eletrônica e são ditas não ionizantes (no contexto biológico). Os efeitos dessas radiações nos organismos não são menos perigosos pelo fato de não provocarem ionizações, pois elas não atuam somente em nível atômico, como acontece com as radiações ionizantes, mas também atuam em nível molecular quando interagem com a molécula de DNA (SCHABERLE & SILVA, 2000). A primeira relação entre danos causados pela radiação UV e os ácidos nucleicos surgiu em 1941, quando Hollaender *et al.* (1986) associaram os comprimentos de onda causadores de lesões com mudanças na taxa de absorvância espectral dos ácidos nucleicos.

Setlow (1961) descreveu os principais tipos de lesões que a radiação UV produz, ou seja, os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e dímeros de (6-4) pirimidina-pirimidona (6-4 fotoprodutos), pela ligação covalente de duas pirimidinas adjacentes. A formação dos CPDs acontece de forma muito mais abundante entre as timinas do que entre as citosinas, ou seja, a formação de dímeros do tipo T-T é significativamente maior do que os do tipo C-C. Dependendo da forma isômera em que esses dímeros se encontram, podem ocorrer grandes distorções na hélice de DNA, o que acarreta na parada obrigatória da replicação. Isso acontece devido a um impedimento de adição de base para a formação de pontes de hidrogênio estáveis. A lesão do tipo fotoproduto 6-4 é produzida pela ligação entre o carbono (C) da posição 6 de uma timina com o C da posição 4 da timina adjacente. Este tipo de fotoproduto é muito mais abundante entre as citosinas do que entre as timinas. Entretanto, quando as citosinas encontram-se metiladas na posição C-5, não há formação do 6-4 fotoproduto. O fotoproduto ocasiona também uma grande distorção na dupla hélice do DNA (HENRIQUES & SAFFI 2003). Os CPDs, dano de DNA típico da radiação UVB (280-315 nm) (SINHA & HÄDER 2002; CADET *et al.*, 2005), têm sido encontrados em quantidades significantes na pele humana exposta à radiação UVA (315 - 400nm) e está diretamente relacionada ao câncer de

pele (COURDAVAULT *et al.*, 2005; MOURET *et al.*, 2006). Danos oxidativos também são induzidos pela radiação UVA (MOURET *et al.*, 2006).

A evolução se encarregou de selecionar diferentes estratégias para minimizar os efeitos deletérios das lesões induzidas no DNA. O primeiro tipo de reparo de DNA caracterizado foi a reversão direta da lesão. Neste caso, uma enzima específica é capaz de reconhecer a lesão e revertê-la ao seu estado normal em uma única reação, sem que seja necessária a sua remoção do DNA. As fotoliasas são enzimas envolvidas na fotoreativação. Elas são capazes de reconhecer especificamente as lesões induzidas pela luz UV (CPDs e 6-4 fotoprodutos) e se ligar a elas formando um complexo. Após a absorção de um fóton de luz (300 - 500nm), a fotoliase é capaz de quebrar a ligação covalente entre as pirimidinas adjacentes, revertendo a lesão. Esta via de reparo dependente de luz é bastante eficiente e homólogos das enzimas fotoliase CPD e 6-4 são encontrados em diversos organismos, como bactérias, peixes, insetos (TODO, 1999).

Outra via de reparo bem estudada é o reparo por excisão, também conhecido como “reparo escuro”, que foi descrita pela primeira vez por SETLOW & CARRIER, (1962; 1963; e 1964), com a observação de que haveria um mecanismo independente de luz, capaz de remover lesões no DNA. Neste processo, a base lesada é retirada e substituída por uma normal após sua remoção do genoma. O reparo por excisão pode ser dividido em reparo por excisão de bases (BER) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER).

O BER é caracterizado pela excisão única e exclusivamente da base lesada. Uma série de enzimas denominadas DNA-glicosilases reconhecem a lesão e promovem a hidrólise da ligação N-glicosil, que liga a base ao esqueleto de fosfato-açúcar do DNA. Como consequência, temos um sítio abásico que é reconhecido por uma AP-endonuclease, capaz de produzir quebras na ligação fosfodiéster a 5’ ou 3’ do sítio básico (SATOH & LINDAHL, 2004). O NER, mais geral e flexível, é capaz de reconhecer e reparar um grande número de lesões não necessariamente relacionadas estruturalmente. Neste caso, as lesões são reconhecidas não pela sua natureza química, mas pelo grau de distorção promovido na hélice de DNA. Essas lesões incluem dímeros de pirimidina e 6-4 fotoprodutos (citosina-timina), timina-glicóis, adutos gerados por psoralenos fotoativos, purinas-cisplatinas, agentes

alquilantes, e adutos formados por carcinógenos policíclicos como o acetilamino-fluoreno, além de pontes intercalantes (HENRIQUES & SAFFI, 2003). O NER ocorre quando a remoção da base defeituosa é feita pela incisão endonucleolítica nos dois lados da lesão, com liberação dos nucleotídeos, seguida pelo preenchimento da região por ação da DNA-polimerase. As principais etapas deste processo de reparação compreendem: reconhecimento da lesão, incisão do dano (3' e 5'), excisão do dano (em torno de 24 a 32 nucleotídeos), síntese de reparação (ressíntese de DNA) e ligação (HENRIQUES & SAFFI, 2003).

O efeito biológico da radiação UV em nível tecidual também merece destaque - sobre os seres humanos a radiação UV exerce uma série de efeitos nocivos, tais como, queimaduras, envelhecimento precoce, depleção do sistema imunológico, catarata e diversos tipos de cânceres de pele (DIFFEY, 1991). Unna (1894) foi o primeiro pesquisador a descrever a relação entre a exposição solar e o câncer de pele. Na pele de humanos, a radiação UV é absorvida por diferentes camadas e depende do comprimento de onda (REICHRATH, 2006). Os raios UVB são quase todos absorvidos pela epiderme, mas somente 30% conseguem penetrá-la onde são parcialmente absorvidos pelos queratinócitos e melanina, e somente 10% alcançam a parte superior da derme. Os raios UVA são mais abundantes do que os UVB, 80% alcançam a derme e 2% atingem a derme profunda. Em contraste com o que ocorre com os raios UVB, o vidro e alguns tecidos não representam uma barreira efetiva contra os efeitos maléficis da radiação UVA, que não são visíveis imediatamente. Por isso, os raios UVA são muito perigosos (FONSECA *et al.*, 2005).

A radiação UV é capaz de penetrar nas sucessivas estruturas oculares a partir da córnea, numa relação diretamente proporcional ao seu comprimento de onda. Parte da radiação UVB consegue atingir o cristalino e apenas uma quantidade muito reduzida alcança a retina. Os raios UVA penetram mais profundamente no olho, a córnea apresenta elevada transmitância a esse comprimento de onda, de forma que o cristalino assume a função principal de absorver a maior parte da UVA. Dos raios UV remanescentes que conseguem atingir a retina, ocorre um predomínio da radiação UVA em relação ao UVB (FONSECA *et al.*, 2005).

Em plantas, a radiação UV causa estresse foto-oxidativo em todos os compartimentos celulares, além de outros efeitos que já foram observados (JANSEN *et al.*, 1998). Estudos

recentes com plantas têm demonstrado um aumento na produção de pigmentos de fotoproteção, como carotenóides e flavonóides, quando expostas à radiação UV. As plantas, nestes ambientes, possuem dois principais mecanismos de proteção: (1) o reparo; e (2) o acúmulo destes pigmentos no tecido mesofílico (SCHMITZ-HOERNER & WEISSENBOCK, 2003).

O efeito da radiação UV sobre os ecossistemas aquáticos está diretamente relacionado com a profundidade e quantidade de partículas em suspensão presentes nos corpos d'água. Na comunidade aquática, a intensidade de radiação diminui com a profundidade. No entanto, animais que necessitam ficar na parte superficial da água, como o fitoplâncton e peixes de respiração aérea obrigatória, sofrem a influência direta desta radiação (KIRCHHOFF, 2003).

Para os peixes, o aumento da mortalidade é a consequência mais prejudicial do excesso de exposição à UVB. O papel da radiação UVA como um agente ambiental nocivo tem sido pouco estudado, apesar de ser o principal componente da radiação ultravioleta solar. Contudo, alguns estudos recentes sobre os efeitos negativos da UVA indicaram que o longo período de exposição a esta radiação afeta o desempenho metabólico e a sobrevivência, como observado em exemplares de acará zebra, *Cichlasoma nigrofasciatum*, por WINCKLER & FIDHIANY (1996), e a elevada mortalidade de ovos como observado na exposição *in situ* de indivíduos de perca amarela, *Perca flavescens*, por WILLIAMSON *et al.* (1997).

Os peixes produzem uma substância denominada guanina ou melanina na sua pele. Estas substâncias apresentam máxima absorção entre 291.8 e 292.8nm e são produzidas para prevenir os danos causados pela radiação UV. Sendo assim, esta radiação é completamente absorvida ou refletida pela melanina ou guanina, não afetando os órgãos internos. Somente em larvas, transparentes, a radiação pode causar lesões a órgãos internos (KAWEEWAT & HOFER, 1997).

Algumas espécies de peixes também já foram estudadas em relação ao reparo celular que ocorre a partir de danos de radiação UV. Vetter *et al.* (1999) estudaram, por exemplo, os danos causados ao DNA pela radiação UVB (280 - 320nm) e a capacidade de reparo de larvas de anchova, *Engraulis mordax*, coletadas em diferentes profundidades e tempos. Os resultados indicam um aumento rápido dos CPDs durante a manhã e uma diminuição dos CPDs à noite, e estes danos foram reparados até a manhã seguinte. Outras espécies também já foram estudadas,

como *Xipho signum* (MITCHELL *et al.*, 2004) e *Carassius auratus* (WIEGAND *et al.*, 2004), e apresentam resultados similares.

### 1.3 PEIXES COMO BIOINDICADORES

Para investigação *in situ* dos efeitos mutagênicos (monitoramento ambiental), há um crescente interesse no desenvolvimento de bioindicadores (MINISSI *et al.*, 1996; LEMOS *et al.*, 2007). Diversos bioensaios com peixes, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, vêm sendo usados como sistemas modelo para estudos bioquímicos, toxicológicos e de desenvolvimento. Os peixes respondem de forma similar aos mamíferos em bioensaios, como aqueles que analisam a resposta bioquímica a agentes químicos, como danos oxidativos em hepatócitos. As vantagens do uso de peixes como organismos modelo incluem a facilidade com que essas espécies podem ser mantidas em laboratório e expostos a agentes químicos (SILVA *et al.*, 2003).

Organismos aquáticos como peixes acumulam poluentes diretamente da água contaminada e indiretamente pela ingestão de organismos aquáticos contaminados. Poluentes genotóxicos ameaçariam não apenas os organismos aquáticos, mas também o ecossistema aquático e finalmente, o homem, que se alimenta de peixes.

Diferentes testes têm demonstrando a eficiência de peixes no biomonitoramento. O teste de micronúcleos tem sido usado em peixes para acessar a genotoxicidade de águas sob condições laboratoriais e de campo (DE FLORA *et al.*, 1993; AL-SABTI, 1995; AL-SABTI & METCALFE, 1995; MATSUMOTO & CÓLUS, 2000; OLIVEIRA, 2003; RUSSO *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2004a; VANZELLA *et al.*, 2007). Este teste, em peixes, tem potencial para detecção de substâncias clastogênicas no ambiente aquático. Uma vez que os eritrócitos de teleosteos são nucleados, micronúcleos têm sido descritos em eritrócitos de peixes como uma medida da atividade clastogênica. Vários estudos têm mostrado que eritrócitos periféricos de diferentes espécies de peixes têm uma alta incidência de micronúcleos após a exposição a diferentes poluentes, sob condições de campo e laboratório (AL-SABTI &

METCALFE, 1995; MINISSI *et al.*, 1996; AYLLON *et al.*, 2000; GRISOLIA & STARLING, 2001; BOMBAIL *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004b; VANZELLA *et al.*, 2007).

Outro teste que vem se destacando, conforme dados da literatura sobre monitoramento genotóxico em organismos aquáticos, é o ensaio cometa. ANDRADE *et al.* (2004b) realizaram um estudo utilizando peixes como bioindicadores e o ensaio cometa como biomarcador. Diferentes concentrações de metil metanosulfonato (MMS) em diferentes temperaturas (25°C e 37°C) foram utilizadas, sendo o objetivo avaliar a sensibilidade de duas espécies de peixes (tainhas e bagres) em relação às doses e à temperatura. Uma clara dose-resposta quanto ao dano ao DNA ocorreu tanto para tainhas quanto para bagres, tanto para as doses de MMS, quanto para o tempo de exposição.

Vários outros estudos demonstram o potencial do ensaio cometa para detectar quebras das fitas do DNA em células de peixe, induzidas por uma gama de genotóxicos (NACCI *et al.*, 1996; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998; COTELLE & FERARD, 2003; KAMMANN *et al.*, 2000; LEE & STEINERT, 2003; FRENZILLI *et al.*, 2004, VANZELLA *et al.*, 2007). Alguns estudos utilizam a combinação de diferentes testes. Com a preocupação de investigar a relação entre contaminação aquática e efeitos genotóxicos, Akcha *et al.* (2003) realizaram um estudo *in situ* com o peixe *Limanda limanda*, coletado em diferentes locais no Canal Inglês (sudeste da França) conhecido por estar contaminado por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e bifenil policlorado (PCB). Adutos de DNA no fígado e quebras de DNA em células sanguíneas foram determinados pela técnica Post-labelling e pelo ensaio cometa, respectivamente. Com os dados do ensaio cometa, dois grupos de locais que parecem estar de acordo com os níveis de poluição foram distinguidos. Já os resultados dos níveis de adutos não apresentaram diferenças significativas entre os locais.

Outros autores, em diferentes ambientes aquáticos, demonstraram, em condições variadas, a eficiência do teste de micronúcleos e ensaio cometa no biomonitoramento (PANDRANGI *et al.*, 1995; MINISSI *et al.*, 1996; DEVAUX *et al.*, 1998; BOMBAIL *et al.*, 2001; RAJAGURU *et al.*, 2003). Estes resultados indicaram, acima de tudo, uma estreita relação entre a frequência de micronúcleos e danos no DNA com a qualidade da água dos ambientes analisados, comprovando, desta forma, a importância e a adequação do emprego de

bioensaios de genotoxicidade para avaliação de sistemas aquáticos sujeitos aos impactos da poluição de origem urbana.

Muitas espécies de peixes têm demonstrado ser bons bioindicadores de poluição em estudos *in situ*: *Barbus plebejus* (MINISSI *et al.*, 1996), *Oncorhynchus mykiss* (RODRIGUEZ-CEA *et al.*, 2003) *Carassius sp*, *Zacco platypus*, *Leiognathus nuchalis* e *Ditrema temmincki* (HAYASHI *et al.*, 1998), *Salmo trutta*, *Anguilla anguilla*, *Phoximus phoximus* (RODRIGUEZ-CEA *et al.*, 2003).

Na Amazônia, o tambaqui, *Colossoma macropomum*, vem sendo utilizado como organismo biomonitor (BRUST & PINTO 2005; ARAÚJO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Estudos comprovam que a exposição de juvenis de tambaqui ao petróleo e ao dispersante em combinação ao petróleo desencadeia alterações nos níveis de glicose sangüínea, de lactato plasmático, na concentração de hemoglobina e na porcentagem de hematócitos (ARAÚJO *et al.*, 2005). Até o momento, não foram registrados estudos utilizando o pirarucu, *Arapaima gigas*, como organismo biomonitor.

## 1.4 ORGANISMOS BIOINDICADORES

### 1.4.1 *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

A espécie *Colossoma macropomum* (Figura 4), conhecida na Amazônia por tambaqui, pertence à ordem Characiformes, família Serrasalminidae. É uma espécie de peixe nativa da bacia amazônica e possui alto valor comercial, sendo muito apreciada pela população local. Pode atingir até um metro de comprimento e chegar a 30 kg de peso (GOULDING & CARVALHO, 1982; GOULDING, 1993; ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). No ambiente natural, o tambaqui é onívoro com tendência zooplactofágo, na fase jovem, e frugívoro exclusivo, quando adulto (SAINT-PAUL, 1984). FREEMAN (1995) considerou o tambaqui como o principal frugívoro da várzea. Isto foi confirmado por SILVA (2003b), ao analisar o trato digestório desta espécie, sugerindo que o zooplâncton só é consumido em uma época específica do ano, quando os frutos não estão disponíveis.

SILVA *et al.* (2003b) concluíram que pelo menos 133 espécies de árvores produzem frutos e sementes consumidos durante a enchente dos rios, sendo encontrados inteiros ou triturados no conteúdo estomacal. A grande disponibilidade de frutos e sementes leva a espécie a incluir em sua dieta uma mistura destes para conseguir melhor equilíbrio de proteína, carboidratos, gorduras e vitaminas (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998).



**Figura 4.** Exemplar juvenil de *Colossoma macropomum* (tambaqui)

Em cativeiro, aceita ração, o que, em conjunto com sua rusticidade, faz da espécie uma das mais utilizadas na piscicultura na região (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). O tambaqui, quando exposto à hipoxia, apresenta como adaptação o desenvolvimento do lábio inferior, que serve para capturar o oxigênio presente na lâmina superficial da coluna d'água. Com o retorno das condições normais de oxigênio dissolvido na água, essa adaptação morfológica regride (BRAUM & JUNK, 1982; ALMEIDA-VAL & VAL, 1995).

O tambaqui é uma espécie de fácil manuseio e manutenção em laboratório. Aspectos da sua fisiologia, genética, bioquímica e ecologia já foram descritos na literatura especializada (TEIXEIRA & JAMIESON, 1985; SAINT-PAUL, 1988; VAL & ALMEIDA-VAL, 1995; WOOD *et al.*, 1998). Além disso, o tambaqui tem sido utilizado como espécie alvo em estudos com diversos tipos de agentes estressantes como pH (WOOD *et al.*, 1998; ARIDE *et al.*, 2007), hipoxia (VAL, 1995; CHIPPARI-GOMES *et al.*, 2005), temperatura (MOURA *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2001), petróleo e seus derivados (COSTA *et al.*, 1996; MACO GARCIA, 1997; VAL & ALMEIDA-VAL, 1999) e metais como o zinco (MATSUO *et al.*, 2001), o



alumínio (MATSUO & VAL, 2003), o cobre (MENEZES, 2002; OLIVEIRA, 2003; MATSUO *et al.*, 2005) e o cádmio (HONDA *et al.*, 2005; MATSUO *et al.*, 2005). Isso possibilita comparações com o estudo dos efeitos genotóxicos da radiação ultravioleta, visto que esta espécie fica exposta com mais frequência a este tipo de radiação.

#### 1.4.2 *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829)

O pirarucu, *Arapaima gigas* (Figura 5) integra a Classe Actinopterygii e Ordem Osteoglossiformes, sendo a única espécie da Família Arapaimidae. É uma espécie estritamente Sul-americana, distribuída amplamente na Bacia Amazônica. Segundo Menezes (1951), as brânquias do pirarucu apresentam relativa atrofia, o que as torna insuficientes para o suprimento de oxigênio à grande massa muscular deste peixe. Isto seria a causa do desenvolvimento e aperfeiçoamento da bexiga natatória como órgão respiratório complementar. O funcionamento da bexiga natatória como órgão respiratório, explica, segundo Menezes (1951), a necessidade que tem o pirarucu de sair à superfície em períodos quase rítmicos de 15 minutos. Porém, quando o peixe é perseguido, pode permanecer sob a água até 40 minutos.



**Figura 5.** Exemplar adulto de *Arapaima gigas* (pirarucu)

A tentativa de entender a biologia do pirarucu foi iniciada pelos estudos de Gudger (1943) e Fontenele (1948), que descreveram aspectos biológicos, tais como hábito alimentar, padrão reprodutivo e comportamental deste peixe. A morfologia deste peixe foi estudada por autores como Greenwood & Liem (1984), Meunier (1984), Saidel & Braford (1987), Pinese (1996), Emde & Prechtel (1999), e muitos aspectos bioquímicos são bem conhecidos (ISAACKS *et al.*, 1977; FIELDS *et al.*, 1978; GALDAMESPORTUS *et al.*, 1979; VAL *et al.*, 1992; WEST *et al.*, 1999). A genética, entretanto, ainda é pouco conhecida. Farias *et al.* (2003) utilizaram microssatélites para determinar níveis de variabilidade genética das populações da bacia amazônica e registraram um alto nível de variabilidade intra-populacional, o que significa, segundo os autores, que a população estudada tem condições genéticas satisfatórias para se manter no ambiente.

## **1.5 BIOMARCADORES DESTE ESTUDO**

Existem diferentes testes para a identificação e caracterização de mutações, dependendo do tipo de lesão que se quer identificar. Estes incluem a presença de DNA adutos, aberrações cromossômicas, quebras da fita do DNA, presença de micronúcleo e outras anomalias nucleares freqüentes (BOMBAIL *et al.*, 2001). Em relação à exposição à radiação UV, vários biomarcadores têm sido utilizados para detectar os efeitos desta radiação em diferentes espécies de seres vivos, principalmente peixes. Salo *et al.* (2000) realizaram um estudo utilizando uma espécie de peixe como bioindicador e as alterações hematológicas como biomarcadores. Quando expostos à radiação UVA e UVB, segundo estes autores, espécimens de *Rutilus rutilus* apresentaram alterações no sistema imune. A radiação UVA causou diminuição do hematócrito e aumentou o número de leucócitos e de proteínas plasmáticas, enquanto a exposição à UVB resultou no aumento do cortisol, mostrando que a radiação UVA e UVB são moduladores da defesa imune desses peixes.

Os métodos que são mais amplamente empregados para detecção de mutações gênicas são aquelas que utilizam as bactérias (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*). Estes são relativamente simples, reproduzíveis e dão resultados confiáveis de interação do produto com o DNA. Contudo, as bactérias são organismos simples, e os resultados obtidos nem sempre são válidos para células animais ou outros eucariontes. Para se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos, existem testes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em células de mamíferos em culturas, em *Drosophila*, ou mesmo mutações somáticas em mamíferos pelo teste de HGPRT (gene de hipoxantina-guanina phosphoribosil-transferase, ligado ao cromossomo X dos mamíferos), ou o “mouse spot test” (alteração da cor do pelo em camundongos tratados durante a embriogênese) (SILVA *et al.*, 2003a).

Para detecção de mutações cromossômicas, os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que estes testes exigem que as células estejam em estado proliferativo (TICE *et al.*, 1998; LE CURIEUX *et al.*, 1993). O estudo de aberrações cromossômicas possibilita a identificação de quase todas as alterações na estrutura do cariótipo, escapando apenas as bem pequenas, não visíveis ao microscópio. Mas, atualmente, por haver técnicas para detecção de mutações cromossômicas mais rápidas e simples, como o teste de micronúcleos, o estudo de aberrações cromossômicas é apenas utilizado em situações recomendadas, como dirimir dúvidas, definir os tipos de mutação e validar outras metodologias (VILLELA *et al.*, 2003). Estes testes têm um sistema de validação internacional, e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* como *in vivo*, desde que se conheça adequadamente a biologia do organismo-teste (VILLELA *et al.*, 2003). Recentemente, o ensaio cometa (Single Cell Gell Electrophoresis - SCGE), que detecta quebras no DNA, tem sido muito utilizado como biomarcador ambiental (FARBAIRN *et al.*, 1995; TICE, 1995; ANDRADE *et al.*, 2004a; b), sendo um teste realizado em células individuais não proliferativas.

Dentre todas estas metodologias se destacam, e foram utilizadas neste estudo, o teste de micronúcleos e o ensaio cometa em sangue periférico, por serem relativamente simples e econômicos. Além disso, é possível avaliar a genotoxicidade sem o sacrifício dos animais.

### 1.5.1 Ensaio Cometa

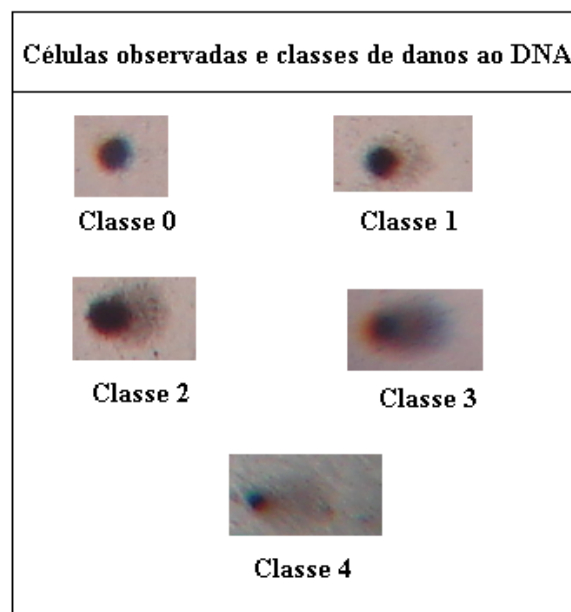
O ensaio cometa (EC) (“Single Cell Gel electrophoresis”) é uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA em células individuais de mamíferos (SINGH *et al.*, 1988; FARBAIRN *et al.*, 1995). Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre estas a necessidade de somente um pequeno número de células e de não serem necessárias células em divisão. Existem dois tipos de protocolos para este teste: (a) tratamento neutro, que detecta dupla quebra no DNA; e (b) tratamento alcalino, que detecta quebra simples e duplas no DNA e/ou danos alcali-lábeis (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

Atualmente, o método já foi adaptado a qualquer tipo de célula isolada (MIYAMAE *et al.*, 1998), além de ser aplicado a diversos organismos. Por exemplo, avaliações de genotoxicidade em sistemas aquáticos utilizando EC já foram descritas com diferentes tecidos de peixes, *Ameiurus nebulosus* e *Cyprinus carpio* (PANDRANGI *et al.*, 1995); com moluscos, *Pantunopecten yessoensis* e *Tapes japonica* (SASAKI *et al.*, 1997), *Limnoperna fortunei* (VILLELA *et al.*, 2006; VILLELA *et al.*, 2007), e também com algumas espécies de anfíbios anuros, *Rana clamitans* e *Bufo americanus* (RALPH *et al.*, 1997) e *Rana catesbeiana* (CLEMENTS *et al.*, 1997), além de ponta de raiz de *Vicia faba* (KOPPEN & VERSCHAEVE, 1996). Para sistemas terrestres, também se observa diferentes organismos monitorados com o EC, como minhocas, *Eusemia foetida* (VERSCHAEVE & GILLES, 1995; SALAGOVIC *et al.*, 1996); pequenos roedores, *Ochrotomys nuttalli* (NASCINBENI *et al.*, 1991), e o próprio homem (LEBAILLY *et al.*, 1998). Assim, além das células sanguíneas, outras células também podem ser utilizadas, mas estas têm que ser liberadas em forma de suspensão.

As células englobadas em gel sobre uma lâmina de microscopia são submetidas a uma corrente elétrica, que faz migrar para fora do núcleo os segmentos de DNA livres, resultantes de quebras. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (Figura 6). Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos,

e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (FAIRBAIRN *et al.*, 1995). Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional ao dano que foi causado (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993), mas somente é de consenso que a visualização do "cometa" significa dano ao nível do DNA, podendo ser quebra simples, duplas e/ou lesões álcali-lábeis (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993; FAIRBAIRN, 1995; TICE, 1995).

A identificação do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras: uma forma é medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular reticulada; a outra forma é classificar visualmente, de acordo com o tamanho da cauda, em cinco classes: sem danos – classe 0 até danos máximos – classe 4 (figura 6) (COLLINS *et al.*, 1997; SPEIT & HARTMANN, 1996). Assim, o índice de danos de cada grupo estudado pode ir do zero (100X0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100x4; 100 células observadas com dano máximo). Esta análise tanto pode ser feita visualmente como utilizando (ou: com o auxílio de ) programas computacionais especiais.



**Figura 6.** Ensaio Cometa: eritrócitos de peixes expostos a radiação ultravioleta, corados com nitrato de prata, mostrando as diferentes classes: sem danos – classe 0 até danos máximos – classe 4.

### 1.5.2 Teste de Micronúcleos

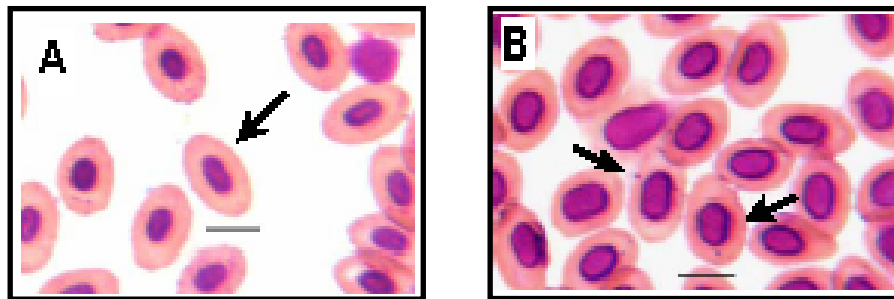
Os micronúcleos foram descritos no citoplasma de eritrócitos há mais de um século, e foram chamados de “fragmentos do material nuclear” por Howell ou “corpúsculos intraglobulares” por Jolly, no final do século XIX e início do XX. Devido a esta descoberta, os hematologistas chamaram esta estrutura de “corpúsculo de Howell-Jolly” (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

Evans *et al.* (1959) *apud* Heddle *et al.* (1983) usaram a frequência de micronúcleos para medir o dano citogenético induzido em células de raízes de *Vicia faba* por raios nêutrons e gama na presença e ausência de oxigênio. Na década de 70, Schmid (1975) e Heddle (1973) recomendaram o uso de células da medula óssea de camundongos para detectar danos causados por mutágenos químicos e demonstraram uma conexão entre frequência de micronúcleo e danos citogenéticos. Entre os testes desenvolvidos para investigar genotoxicidade, o teste de micronúcleos tem se provado sensível e já foi utilizado em diversos organismos, como roedores (SILVA *et al.*, 2000), aves (PINHATTI *et al.*, 2006), moluscos (VILLELA *et al.*, 2007) e também algumas espécies de peixes: *Anguilla anguilla* (RODRIGUEZ-CEA *et al.*, 2003), *Netuma sp* e *Mugil sp* (ANDRADE *et al.*, 2004b), *Apteronotus bonapartii* (BÜCKER *et al.*, 2005), *Liposarcus pardalis* e *Astronotus ocellatus* (NASCIMENTO *et al.*, 2005), *Pimephales promelas* (WINTER *et al.*, 2007).

Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos similares em estrutura ao núcleo, constituídos de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separado do núcleo principal, como apresentado na Figura 7. Tem sido demonstrado que, quando a membrana nuclear é refeita, o DNA serve de catalisador para se formar um completo envelope nuclear em torno dele (ALBERTS *et al.*, 1989). Por esta característica, qualquer fragmento ou cromossomo(s) inteiro(s) separado(s) do núcleo principal, forma(m) um pequeno núcleo, que é denominado de micronúcleo. Os eritrócitos, células abundantes na medula óssea e sangue periférico de mamíferos, são particularmente propícios por sua alta rotatividade, ausência de núcleo e possibilidade de diferenciar eritrócitos jovens pela presença de RNA (WILD, 1978). O eritrócito recém-formado contém RNA ribossomal, responsável pela síntese das

hemoglobinas. Devido a isso, pode ser corado diferencialmente com corante para ácidos nucléicos, como, por exemplo, o Giemsa, sendo desta forma denominados de eritrócitos policromáticos (EPC). Este tipo celular jovem pode permanecer estável por mais ou menos 24 horas após a expulsão do núcleo nas células dos mamíferos. Já os eritrócitos maduros são denominados de normocromáticos (ENC) por apresentarem quase apenas hemoglobina (SALAMONE & HEDDLE, 1983; HAYASHI *et al.*, 1994; MAVOURNIN *et al.*, 1990).

A análise de EPC tanto na medula óssea como no sangue periférico é igualmente aceita para as espécies nas quais o baço não remova os eritrócitos micronucleados (ASANAMI *et al.*, 1995). Como consequência para as espécies onde isto ocorre, pode-se visualizar MNs no baço, cujo tecido para os testes de MNs é tão efetivo quanto o da medula óssea (KRISHNA *et al.*, 1994). Os ENC são também aceitos para análise de MN quando a duração da exposição aos agentes excede quatro semanas, ou seja, uma exposição crônica (HAYASHI *et al.*, 1994).



**Figura 7.** Micronúcleo de esfregaço sanguíneo de peixe: (A) célula normal e (B) célula com micronúcleo.

## 2. OBJETIVOS

A Amazônia está localizada na região equatorial, e, por isso, tende a receber uma maior quantidade de radiação UV. Além disso, ações antrópicas, como desmatamento e assoreamento provocam mudanças nos ambientes aquáticos e potencializam os efeitos da radiação UV nesta região. Com essas mudanças, o índice de radiação UV deverá aumentar, podendo causar efeitos danosos em todos os seres vivos, incluindo aqueles que vivem nos ecossistemas aquáticos. Assim, este estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito genotóxico da radiação UV (UVA+UVB) por meio de dois biomarcadores em duas espécies de peixes da ictiofauna tropical, sendo elas muito utilizados na piscicultura. Portanto, propõem-se:

- (1) avaliar o efeito genotóxico das radiações UVA e UVB sobre as células das espécies tambaqui, *Colossoma macropomum* e pirarucu, *Arapaima gigas*, em função do tempo de exposição, utilizando os ensaios cometa e micronúcleo;
- (2) verificar se existe correlação entre a sensibilidade à mutagenicidade e a espécie bioindicadora e se esta resposta apresenta uma relação com dose;



**3. ARTIGO A SER SUBMETIDO A AQUATIC TOXICOLOGY:  
UVA/UVB-INDUCED LESION REPAIR AND GENOTOXICITY IN THE  
AMAZONIAN FISHES COLOSSOMA MACROPOMUM AND  
ARAPAIMA GIGAS**

**UVA/UVB-INDUCED LESION REPAIR AND GENOTOXICITY IN THE  
AMAZONIAN FISHES *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas***

**Aline Aparecida Groff** <sup>1,2</sup>

**Juliana da Silva** <sup>2</sup>

**Emilene A.Nunes** <sup>2</sup>

**Martus Ianistcki** <sup>2</sup>

**Alzira Miranda de Oliveira**<sup>3</sup>

**Christiane Patrícia Feitosa de Oliveira**<sup>3</sup>

**Adalberto Luis Val** <sup>3</sup>

**João A. P. Henriques** <sup>1,2 \*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biofísica / Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9500, 91507-970 Porto Alegre - RS, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Genética Toxicológica, PPGGTA & PPGEICIM, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas - RS, Brazil.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, AM, Brazil.

\* Corresponding author. E-mail address: [pegas@cbiot.ufrgs.br](mailto:pegas@cbiot.ufrgs.br)

## Abstract

Ultraviolet Radiation (UVR) has been known to cause adverse effects to aquatic species and aquatic environments. Ozone depletion is the cause of increased UVR at the ground level, especially at high latitudes. Tambaqui and pirarucu fishes live in the Amazon basin, close to the Equator, and thus receive a higher intensity of ultraviolet radiation. Aggravating the problem, deforestation contributes to the higher incidence of UVR. The aim of this study was to evaluate the genotoxic effects of UVA and UVB irradiation on *C. macropomum* and *A. gigas* erythrocytes using micronuclei and comet assays. Our study showed that UV caused DNA damage in both species as detected by the Comet assay, as well as differences between both species as to genotoxicity response, possibly related to their evolutionary history. Tambaqui was exposed for to UVR different periods, and displayed a clear dose-response DNA damage profile. Significant damage repair was observed 24h after UVR exposure cessation. Four exposure doses ( $120.96 \text{ J/cm}^2$  UVA +  $259.20 \text{ J/cm}^2$  UVB) resulted in an increase in micronucleated cells in tambaqui, both under normoxia and hypoxia, as compared to the control group. Tambaqui proved to be more sensitive to UVR, as detected by Comet assay and MN test than pirarucu, and showed a statistically higher baseline DNA damage than pirarucu. Finally, the results of our study indicated that the alkaline Comet assay was more sensitive than the MN assay for detecting genotoxicity due to UV exposure, mainly because the main damage probably involved was single strand break induced by ROS. In addition, this study also suggested that the repair systems involved were base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) in the conditions of this experiment, and that tambaqui and pirarucu are useful sentinel organisms, presenting adequate sensitivity to be effective monitors of biological hazards in the Amazon region.

**Key words:** Ultraviolet Radiation, Comet assay, micronucleus test, *Colossoma macropomum*, *Arapaima gigas*, Amazon Region.

## 1. Introduction

Ultraviolet light is generally classified into three categories: UVA (400–315 nm), UVB (315–280 nm), and UVC (280–100 nm), and has long been known to cause adverse effects on aquatic organisms (reviewed by Häder et al., 2003). The discovery of the “ozone hole” over Antarctica (Farman et al., 1985) has stimulated much of the recent research on the biological effects of UVR (UVR) on aquatic environments.

Exposure to solar UVR can reduce productivity, affect reproduction and development, and increase mutation rates in phytoplankton, macroalgae, eggs, and larval stages of fish and other aquatic animals (Sinha and Häder, 2002; Häder, 2003; Häder et al., 2007). Increased mortality is the most detrimental consequence of overexposure of fish to UVB (Salo et al., 2000). The role of UVA radiation as a noxious environmental agent has been much less studied, despite being the main component of solar ultraviolet radiation and having greater penetration in water than UVB radiation (Huovinen and Penttila, 2000).

UVR has a number of properties that makes it a relevant environmental factor. First, UV carries more energy per photon than any other wavelength reaching the Earth surface. Such high-energy photons can potentially damage many biological molecules (e.g., DNA and proteins) (Zagarese and Williamson, 2001; Pfeifer et al., 2005; Cadet et al., 2005; Olson and Mitchell, 2006; Häder, 2007). The two main DNA lesions induced by solar UVA e UVB radiations cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), particularly thymine dimers (TTs) and pyrimidine pyrimidone photoproducts (6-4PPs) (Vink and Roza, 2001; Sinha and Häder, 2002; Cadet et al., 2005; Häder and Sinha, 2005; Tedetti and Sempéré, 2006; Dong et al., 2007; Gambichler et al., 2008). In addition, UVR can initiate a series of redox reactions to form reactive oxygen species (ROS), which cause oxidative stress in cells and tissues (Zagarese and Williamson, 2001; Sinha and Häder, 2002; Häder and Sinha 2005; Häder, 2007). The second important characteristic of UVR is its ubiquity. Owing to their dependence on light, primary producers and visually-guided predators, such as fish, are also necessarily exposed to damaging levels of UVR. Thirdly, the combined effect of UVR and other environmental factors may

result in synergistic effects, such as the photoactivation of organic pollutants and photosensitization (Zagarese and Williamson, 2001).

Ozone depletion is the cause of increased UVR at the ground level, especially at high latitudes, such as those of the Amazonian region. Aggravating this problem, deforestation of the Amazon contributes to the higher incidence of UVR on the fish, since the clearings caused by tree felling and forest fires allow the penetration of solar radiation inside the forest, including the freshwater bodies. Deforestation also leads to the silting of rivers, which decreases the size of the water column and exposes even more fish to the surface, along with the increasing contamination of water that leads to low oxygen availability. In order to survive extreme periods of low dissolved oxygen or even anoxia, fish of the Amazon developed several adaptations to uptake oxygen directly from air or from the upper part of the water column. Hypoxia is an environmental condition that can drive fish to the water surface. The tambaqui (*Colossoma macropomum*), is able to expand its lips to explore the water surface (water-air-interface) when exposed to hypoxia. Other species, such as pirarucu (*Arapaima gigas*), developed the ability to continuously breath air as the South American lungfish (locally known as pirambóia) (Val and Almeida-Val, 1999).

Aquatic organisms have developed a number of repair and tolerance mechanisms to counteract the damaging effects of UVR on DNA. Photoreactivation, with the aid of the enzyme photolyase, is one of the most important and frequently occurring repair mechanisms in a variety of organisms. Excision repair, which can be differentiated into base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) (Sinha and Häder, 2002; Häder and Sinha, 2005; Olson and Mitchell, 2006), also plays an important role in DNA repair in several organisms with the aid of a number of glycosylases and polymerases, respectively (Häder and Sinha, 2005).

Comet assay sensitivity is comparable with that of the well-established micronucleus (MN) test. Comet assay alkaline conditions detect a broad spectrum of DNA lesions, that is, DNA single and double-strand breaks and alkali-labile sites and crosslinks. This method has been extensively used in the assessment of radiation-induced DNA damage (Andrade et al., 2004; Cierieszko et al., 2005; Wojcik et al., 2006).

The aim of this study was to investigate the genotoxic and mutagenic effects of UVA and UVB radiations on two Amazon fishes, tambaqui (*C. macropomum*) and pirarucu (*A. gigas*) under laboratory conditions using Comet Assay (Single Cell Gel Assay, SCGA) and Micronucleus Test (MN).

## 2. Materials and Methods

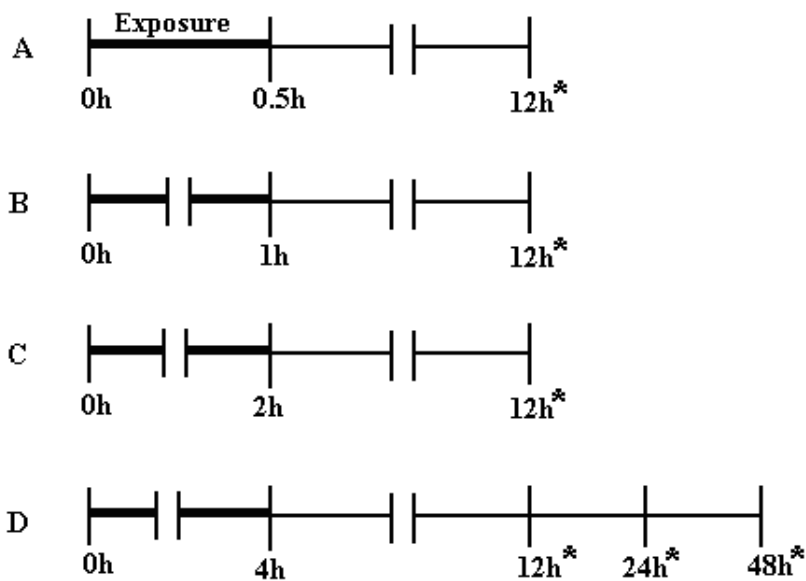
### 2.1 Animals

Juveniles of tambaqui (*C. macropomum*) and pirarucu (*A. gigas*) were obtained from the Balbina Hatchery (Presidente Figueiredo, AM, Brazil). Approximately 15 animals were placed in tanks, where specimens of *C. macropomum* (8.17±0.89 cm of length and 21.70±7.89 g of body weight) were maintained in 3000-L tanks, and *A. gigas* (19.29±0.63 cm of length and 60.40± 5.29 g of body weight) in 5000-L tanks in the Laboratory of Ecophysiology and Molecular Evolution (LEEM-INPA). All fishes were kept under constant aeration and at 28°C. Animals were daily fed with a commercial feed for at least 15 days prior to experiments.

### 2.2 Experimental Design and Sampling

After the adaptation period, fishes were acclimated for 48h to 500-L tanks with aerated fresh water, equipped with physical-biological filters, and isolated from external sources of light by curtains made of black polyethylene. Water temperature and dissolved oxygen were hourly monitored and recorded using a YSI oxygen meter, which was maintained between 26-28°C and 5.0 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. Fishes were exposed to ultraviolet radiation (UVA and UVB) using unfiltered Philips TL40W/05 and TL40W/12 lamps, or to incandescent light bulbs protected with UV filters (control group). Irradiance penetrating the water was measured with an Optical Radiometer UVP, Multi-Sense 100 (Ultra Violet Products, USA), with a range of 290 and 400nm. Lamps were placed in the middle of the tanks, 60 cm above the water surface.

About six individuals were submitted to each treatment: tambaqui and pirarucu were exposed to normal oxygen (normoxia) and tambaqui to acute hypoxia (about  $5\text{h} \pm 2.6\text{mg}$  of  $\text{O}_2$  /L), and both species were exposed to UVR ( $0.504\text{ J/cm}^2$  UVA +  $1.080\text{ J/cm}^2$  UVB) for different periods (0.5 h, 1 h, 2 h, and 4h for tambaqui - both under normoxia and hypoxia condition- and 4h for pirarucu), or not exposed to UVR (0 h= T0), which were used as negative controls. After stop UV exposure, fishes were removed from the tanks at 12h, 24h, and 48h (Figure 1). During the period between UV exposure and removal from the tanks, fishes were kept in the dark. Each experimental group had a corresponding control group. Fishes were not fed during exposure. Fishes were anesthetized with MS 222, and then blood samples were collected from the caudal vessel into syringes containing heparin (liquemine). Two independent experiments were performed. All procedures were carried out according to the international practices of animal use and care, and under the control of an INPA internal committee. This study was approved by the Brazilian National Ethical Committee on Research.



**Figure 1.** Procedure of exposure (0.5, 1, 2 and 4 hours of UV exposition) and sampling of blood for tambaqui (both under normoxia and hypoxia condition) (A-D) and pirarucu (D). \* Sampling at 12h, 24h, and 48h after the exposure periods.

## 2.3 Genotoxic Assay

### 2.3.1 Comet Assay

Blood samples were diluted as 1:120 (v/v) with RPMI 1640 medium, and immediately used. Alkaline Comet assay was performed as previously described (Tice et al., 2000; Andrade et al., 2004), with some adaptations. Briefly, 5  $\mu$ l of each diluted blood sample were added to 95  $\mu$ l of 0.75% (w/v) low melting point agarose, and a portion of the mixture was spread on a microscope slide pre-coated with 1.5% (w/v) normal melting point agarose and covered with a coverslip. After agarose solidified, coverslips were removed, and slides were immersed in a lysis solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris, pH 10.0–10.5) containing 1% Triton X-100 and 20% DMSO. Slides were kept frozen in lysis solution (4 °C) for at least 2 h and for not more than 3 h. They were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH  $\geq$  13) for 20 min for DNA unwinding. Electrophoresis (15 min at 270mA and 25V (0.8 V/cm)) was performed in the same buffer. Every step was carried out under indirect yellow light. After electrophoresis, slides were neutralized in Tris 400mM (pH 7.5), rinsed three times in distilled water, and left to dry overnight at room temperature. Slides were then fixed for 10 min in trichloroacetic acid 15% w/v, zinc sulfate 5% w/v, and glycerol 5% v/v, rinsed three times in distilled water, and dried for 2 h at 37°C. Dry slides were re-hydrated for 5 min in distilled water, and then stained (sodium carbonate 5% w/v, ammonium nitrate 0.1% w/v, and silver nitrate 0.1% w/v, tungstosilicic acid 0.25%, formaldehyde 0.15% w/v, freshly prepared in the dark). Stained slides were rinsed twice with distilled water, and submerged in the stop solution (acetic acid 1%), rinsed again, and immediately coded for analysis. In order to calculate image length (IL), 100 cells from each replicate were randomly chosen (50 from each duplicate slide), and analyzed under optical microscope. For damage index calculation, cells were divided into five classes, according to tail size (Figure 2). The damage index (DI) is the sum of classes of the 100 cells analyzed, and may vary from 0 (all cells undamaged – 0 $\times$ 100) to 400 (all cells damaged – 4 $\times$ 100). Damage index is based on the length of migration and on the amount of



DNA in the tail, and it is considered a sensitive measure of detectable DNA damage. Damage frequency (DF) was calculated as the percentage of cells with tail.

### 2.3.2 The Micronucleus Test

MN test was performed on peripheral blood as a second monitoring system for comparison with the alkaline Comet assay. MN test was carried out according to published protocols (Al Sabti and Metcalfe, 1995; Minissi et al., 1996). Peripheral blood samples were drawn and immediately smeared onto microscope slides, air-dried, and stained for 10 min with a mixture of 10 ml Giemsa and 90 ml phosphate buffer (pH 5.8). Slides were then rinsed with distilled water, air-dried, and examined using optical microscopy. Two blood smears were prepared from each fish and coded for blind analysis. A total of 4,000 erythrocytes were examined for each fish (Figure 3).

### 2.4 Hemoglobin values

Blood was collected by cardiac puncture, and stored in tube containing EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Hemoglobin levels (Hb, g/dl) were colorimetrically determined by measuring the formation of cyanmethemoglobin using a commercial kit (MPR3, Roche).

### 2.5 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's for comparison of DNA DI and DF, and MN for each of exposure times.

### 3. RESULTS

Table I presents the Comet assay results for tambaqui erythrocytes exposed to ultraviolet radiation *in vivo* for different exposure times and oxygen condition (normoxia and hypoxia). There was a general increase in the damage index and damage frequency values from exposed groups of tambaqui normoxia with increased exposure to ultraviolet radiation dose (4>2>1>0.5h). The differences are significant mainly in relation to the 0.5h for tambaqui normoxia and 0.5 and 1h for tambaqui hypoxia. In relation to the control group it was observed for almost all groups significant increase of DNA damage, DI and DF ( $P<0.01$ ), except for the group tambaqui normoxia 0.5h, for DI and tambaqui hypoxia 0.5 and 1h, for DI and DF. The mean values of Damage Index (DI) and Damage Frequency (DF) from control group were significantly higher than T0 (0h/without exposure) of tambaqui and pirarucu erythrocytes.

Results for MN test for tambaqui are presented in Table II. Only for the group 4h ( $120.96 \text{ J/cm}^2$  UVA +  $259.20 \text{ J/cm}^2$  UVB radiation) of exposure it was possible to observe a significant increase of micronucleated cells for tambaqui normoxia and hypoxia conditions in relation to control of the same exposure group ( $P<0.01$ ). There was no significant increase of micronucleated cells from control group in relation to T0.

**TABLE I.** Detection of DNA erythrocyte damage in *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed *in vivo* to ultraviolet radiation (UV) for different exposure times, sampling at 12h after the exposure.

Tambaqui Groups	UV Exposure time and Comet assay parameters													
	T0 <sup>a</sup>			0.5 h (A*)			1 h (B*)			2 h (C*)			4h (D*)	
<b>Normoxia</b>														
Not exposed	N <sup>c</sup>	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	
Exposed <sup>b</sup>	-	10.13 ± 5.48	6	43.33 ± 13.47 <sup>d</sup>	6	49.16 ± 8.95 <sup>d</sup>	6	52.33 ± 9.95 <sup>d</sup>	6	52.33 ± 9.95 <sup>d</sup>	6	65.33 ± 14.66 <sup>d,f</sup>	6	
				58.33 ± 12.95 <sup>d</sup>	6	104.00 ± 5.09 <sup>d,g,h</sup>	6	108.83 ± 22.42 <sup>d,g,j</sup>	6	108.83 ± 22.42 <sup>d,g,j</sup>	6	173.60 ± 22.57 <sup>d,g,i,k,l</sup>	5	
<b>Damage Index (DI)</b>														
	N <sup>c</sup>	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	
Not exposed	8	6.75 ± 3.49	6	19.50 ± 4.41 <sup>d</sup>	6	26.33 ± 3.20 <sup>d,f</sup>	6	28.50 ± 2.58 <sup>d,f,h</sup>	6	28.50 ± 2.58 <sup>d,f,h</sup>	6	34.16 ± 6.17 <sup>d,f,h,j</sup>	6	
Exposed <sup>b</sup>	-	-	6	26.00 ± 4.89 <sup>d,f</sup>	6	45.16 ± 3.37 <sup>d,g,h</sup>	6	53.66 ± 8.28 <sup>d,g,i,j</sup>	6	53.66 ± 8.28 <sup>d,g,i,j</sup>	6	73.80 ± 3.49 <sup>d,g,i,k,l</sup>	5	
<b>Damage Frequency (DF)</b>														
<b>Hypoxia</b>														
Not exposed	n <sup>c</sup>	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	DI ± S.D.	n	
Exposed <sup>b</sup>	-	15.71 ± 11.58	5	39.80 ± 5.40 <sup>e</sup>	6	42.66 ± 9.58 <sup>e</sup>	6	64.66 ± 8.66 <sup>e</sup>	5	64.66 ± 8.66 <sup>e</sup>	6	74.00 ± 22.80 <sup>d</sup>	6	
				51.83 ± 14.38 <sup>e</sup>	6	61.00 ± 7.84 <sup>e</sup>	6	166.16 ± 4.19 <sup>d,g,i,j</sup>	6	166.16 ± 4.19 <sup>d,g,i,j</sup>	6	210.50 ± 54.97 <sup>d,g,i,l</sup>	6	
<b>Damage Index (DI)</b>														
	n <sup>c</sup>	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	DF ± S.D.	n	
Not exposed	7	9.42 ± 6.90	5	20.60 ± 2.60 <sup>d</sup>	6	22.00 ± 3.46 <sup>d</sup>	5	30.66 ± 4.17 <sup>d</sup>	5	30.66 ± 4.17 <sup>d</sup>	6	35.16 ± 10.10 <sup>d,f,h</sup>	6	
Exposed <sup>b</sup>	-	-	6	25.50 ± 6.02 <sup>d</sup>	6	29.00 ± 3.63 <sup>d</sup>	6	74.83 ± 7.96 <sup>d,g,i,j</sup>	6	74.83 ± 7.96 <sup>d,g,i,j</sup>	6	77.00 ± 10.97 <sup>d,g,i,l</sup>	6	

<sup>(a)</sup> T0 = zero hour

<sup>(b)</sup> UV exposure, group 0.5 h (15.12 J/cm<sup>2</sup> UVA + 32.40 J/cm<sup>2</sup> UVB), 1h (30.24 J/cm<sup>2</sup> UVA + 64.80 J/cm<sup>2</sup> UVB), 2h (60.48 J/cm<sup>2</sup> UVA + 120.96 J/cm<sup>2</sup> UVB) and 4h (120.96 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259.20 J/cm<sup>2</sup> UVB).

<sup>(c)</sup> n= Number of individuals obtained from sum of two independent experiments.

<sup>(d)</sup> Significant difference as compared to T0 at P < 0.01 and <sup>(e)</sup> P < 0.05.

<sup>(f)</sup> Significant difference as compared to control of 0.5h at P < 0.01.

<sup>(g)</sup> Significant difference as compared to exposed of 0.5h at P < 0.01.

<sup>(h)</sup> Significant difference as compared to control of 1h at P < 0.01.

<sup>(i)</sup> Significant difference as compared to exposed of 1h at P < 0.01.

<sup>(j)</sup> Significant difference as compared to control of 2h at P < 0.01.

<sup>(k)</sup> Significant difference as compared to exposed of 2h at P < 0.01.

<sup>(l)</sup> Significant difference as compared to control of 4h (12h) at P < 0.01, using ANOVA (Dunnett's test).

\* For schedule details, see figure 1.

**TABLE II.** Mean values of Micronucleated Cells (MN) observed in the erythrocytes of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed *in vivo* to UVR for different exposure times, sampling at 12h after the exposure.

Tambaqui Groups	UV Exposure time and MN/2000 cells (mean $\pm$ standard deviation)													
	T0 <sup>a</sup>			0.5 h (A*)			1 h (B*)			2 h (C*)			4 h (D*)	
	n <sup>c</sup>	MN $\pm$ S.D.	n	MN $\pm$ S.D.	n	MN $\pm$ S.D.	n	MN $\pm$ S.D.	n	MN $\pm$ S.D.	n	MN $\pm$ S.D.	n	MN $\pm$ S.D.
Normoxia	8	0.75 $\pm$ 0.70	6	1.33 $\pm$ 0.81	6	1.66 $\pm$ 1.63	6	1.83 $\pm$ 0.98	6	2.16 $\pm$ 0.40	6	2.16 $\pm$ 0.40	6	2.16 $\pm$ 0.40
Not exposed	-	-	6	1.83 $\pm$ 1.16	6	2.33 $\pm$ 1.36 <sup>d</sup>	6	2.50 $\pm$ 0.54 <sup>d</sup>	6	2.66 $\pm$ 0.81 <sup>d,e</sup>	5	2.66 $\pm$ 0.81 <sup>d,e</sup>	5	2.66 $\pm$ 0.81 <sup>d,e</sup>
Exposed <sup>b</sup>	-	-	6	1.83 $\pm$ 1.16	6	2.33 $\pm$ 1.36 <sup>d</sup>	6	2.50 $\pm$ 0.54 <sup>d</sup>	6	2.66 $\pm$ 0.81 <sup>d,e</sup>	5	2.66 $\pm$ 0.81 <sup>d,e</sup>	5	2.66 $\pm$ 0.81 <sup>d,e</sup>
Hypoxia	7	1.28 $\pm$ 0.48	5	1.50 $\pm$ 1.51	6	2.00 $\pm$ 1.26	5	2.16 $\pm$ 1.16	6	1.33 $\pm$ 0.47	6	1.33 $\pm$ 0.47	6	1.33 $\pm$ 0.47
Not exposed	-	-	6	2.16 $\pm$ 1.47	6	2.33 $\pm$ 1.96	6	2.83 $\pm$ 0.75	6	3.00 $\pm$ 0.89 <sup>d,e</sup>	6	3.00 $\pm$ 0.89 <sup>d,e</sup>	6	3.00 $\pm$ 0.89 <sup>d,e</sup>
Exposed <sup>b</sup>	-	-	6	2.16 $\pm$ 1.47	6	2.33 $\pm$ 1.96	6	2.83 $\pm$ 0.75	6	3.00 $\pm$ 0.89 <sup>d,e</sup>	6	3.00 $\pm$ 0.89 <sup>d,e</sup>	6	3.00 $\pm$ 0.89 <sup>d,e</sup>

(a) T0 = zero hour

(b) UV exposition, group 0.5 h (15.12 J/cm<sup>2</sup> UVA + 32.40 J/cm<sup>2</sup> UVB), 1h (30.24 J/cm<sup>2</sup> UVA + 64.80 J/cm<sup>2</sup> UVB), 2h (60.48 J/cm<sup>2</sup> UVA + 129.60 J/cm<sup>2</sup> UVB) and 4h (120.9 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259.20 J/cm<sup>2</sup> UVB).

(c) n= Number of individuals obtained from sum of two independent experiments.

(d) Significant difference as compared to T0 at P < 0.01.

(e) Significant difference as compared to control of 4h at P < 0.01, using ANOVA (Dunnett's test).

\* For schedule details, see figure 1.

Table III shows the results of Comet assay and Micronuclei test of pirarucu erythrocytes exposed *in vivo* to ultraviolet radiation for 4h (120.96 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259.20 J/cm<sup>2</sup> UVB radiation). Significant differences were observed between the exposed and the control groups, both as to DI and DF (P<0.01). DI and DF mean values of the pirarucu control group of were higher than T0 (P<0.01). No significant differences in micronucleated cells were observed between control and exposed groups. .

**TABLE III.** Detection of DNA Damage and Micronucleated Cells (MN) (mean ± standard deviation) in the Erythrocytes of *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed *in vivo* to ultraviolet radiation (UV) for 4h, sampling at 12h after the exposure.

Pirarucu Groups	Comet assay				Micronuclei test	
	n <sup>c</sup>	Damage Index (DI)	n	Damage Frequency (DF)	n	MN/2000 cells
T0 <sup>a</sup>	6	12.50 ± 3.08	6	7.00 ± 1.41	5	0.80 ± 0.83
<b>4h (D*)</b>						
Not Exposed	4	54.00 ± 4.39 <sup>d</sup>	4	27.25 ± 2.98 <sup>d</sup>	5	1.60 ± 0.89
Exposed <sup>b</sup>	5	95.40 ± 27.49 <sup>d,e</sup>	5	40.00 ± 10.41 <sup>d,e</sup>	5	2.00 ± 0.70

(a) T0 = zero hour

(b) UV exposition, 4h (120.9 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259.20 J/cm<sup>2</sup> UVB).

(b) UV exposition.

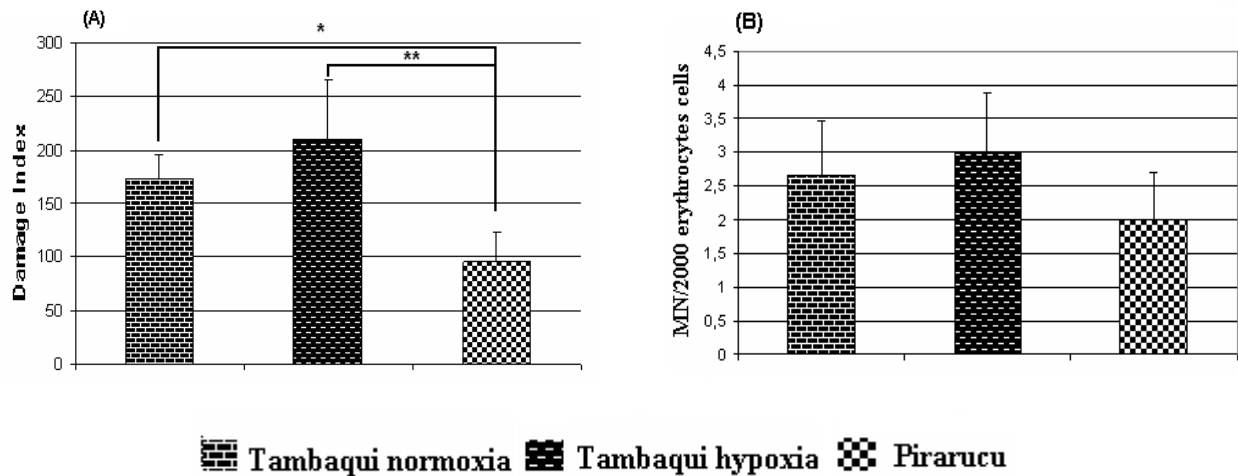
(c) n= Number of individuals obtained from sum of two independent experiments;

(d) Significant difference as compared to T0 at P < 0.01;

(e) Significant difference as compared to 4h Control at P < 0.01, using ANOVA (Dunnet's test).

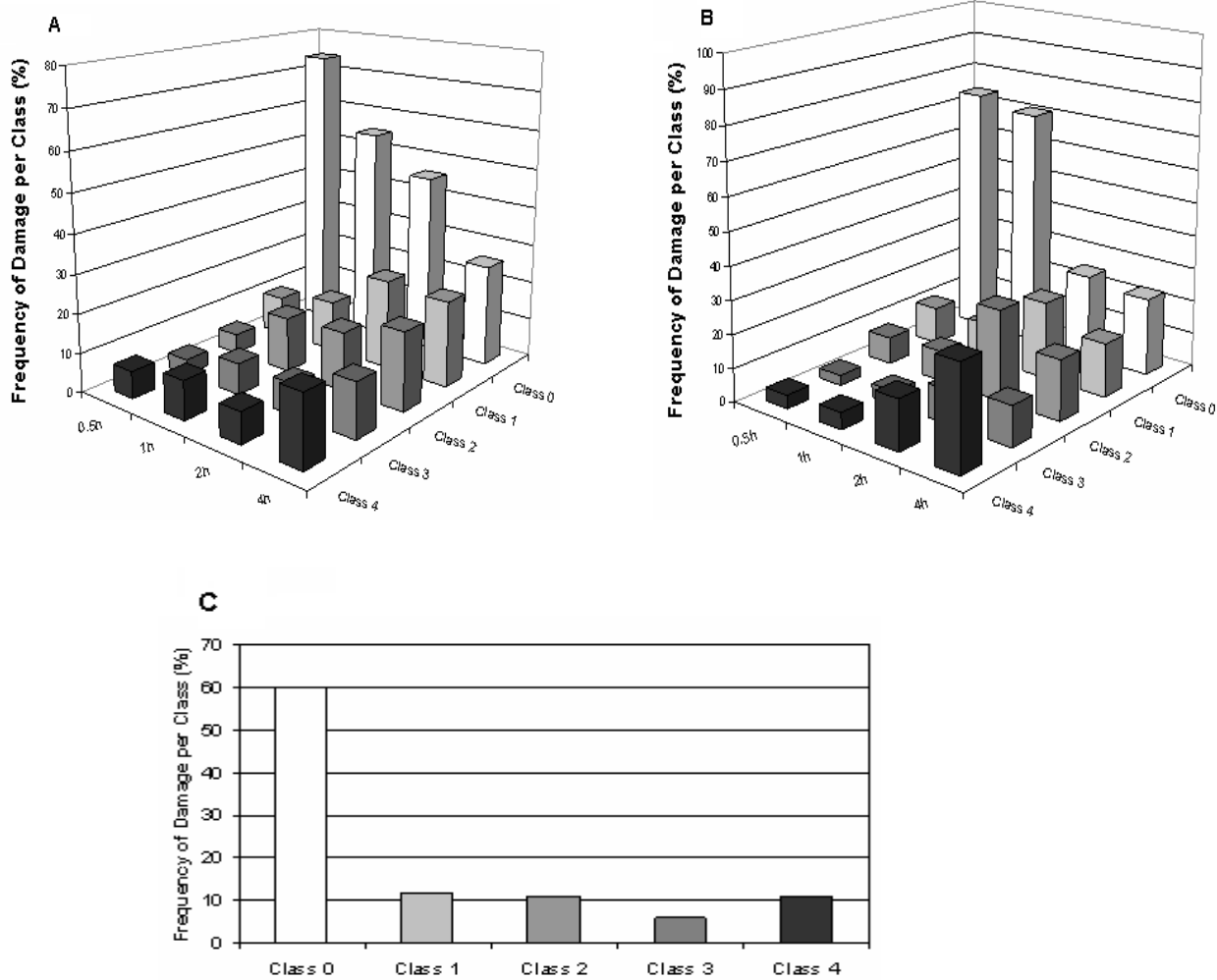
\* For schedule details, see figure 1.

Figure 2 shows a comparison between Comet assay and MN test results of tambaqui and pirarucu exposed to UV for 4h (120.96 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259.20 J/cm<sup>2</sup> UVB radiation). There were no differences in DNA damage between tambaqui under normoxia or hypoxia, but pirarucu values were significantly lower than those of tambaqui.



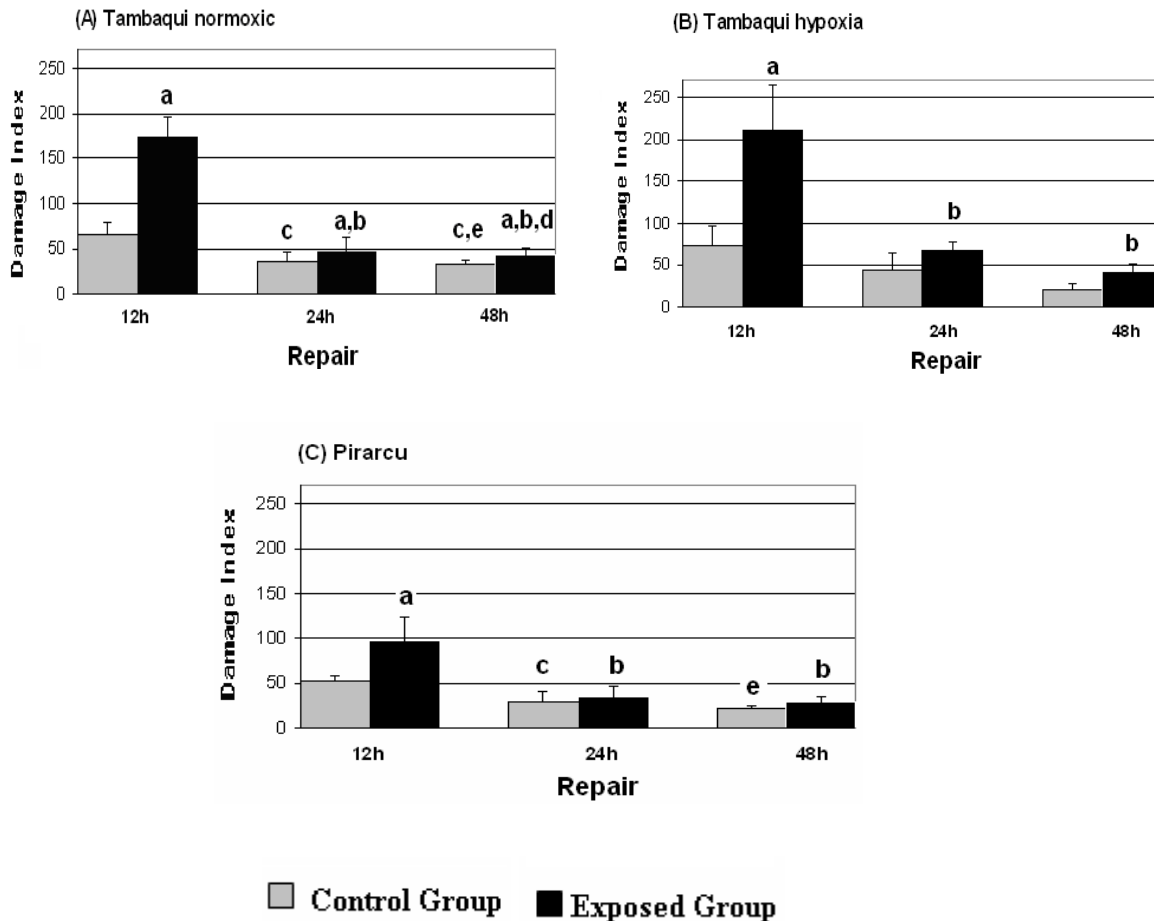
**Figure 2.** Comparison between Comet assay (A) and MN test (B) results (means and standard deviations) of tambaqui and pirarucu exposed to ultraviolet radiation for 4h, sampling at 12h after the exposure. \*\* Significant at P<0.01, \* Significant at P<0.05; ANOVA, Dunnett's test.

Figure 3 shows the extent of DNA damage, as analyzed by Comet assay, according to damage classes (0-4). Classes 1, 2, and 3 were the most frequent among the damaged cells of tambaqui under normoxia and hypoxia, as well as pirarucu. Class 4 damage frequency was higher than 10% in tambaqui under normoxia (18% for 4h of exposure) and hypoxia (31% for 4h and 15% for 2h), and in pirarucu (11%).



**Figure 3.** Distribution of damaged cells in Comet assay into damage classes. (A) tambaqui under normoxia; (B) tambaqui under hypoxia; (C) pirarucu. The percentage of cells in each class was calculated based on 100 cells per fish.

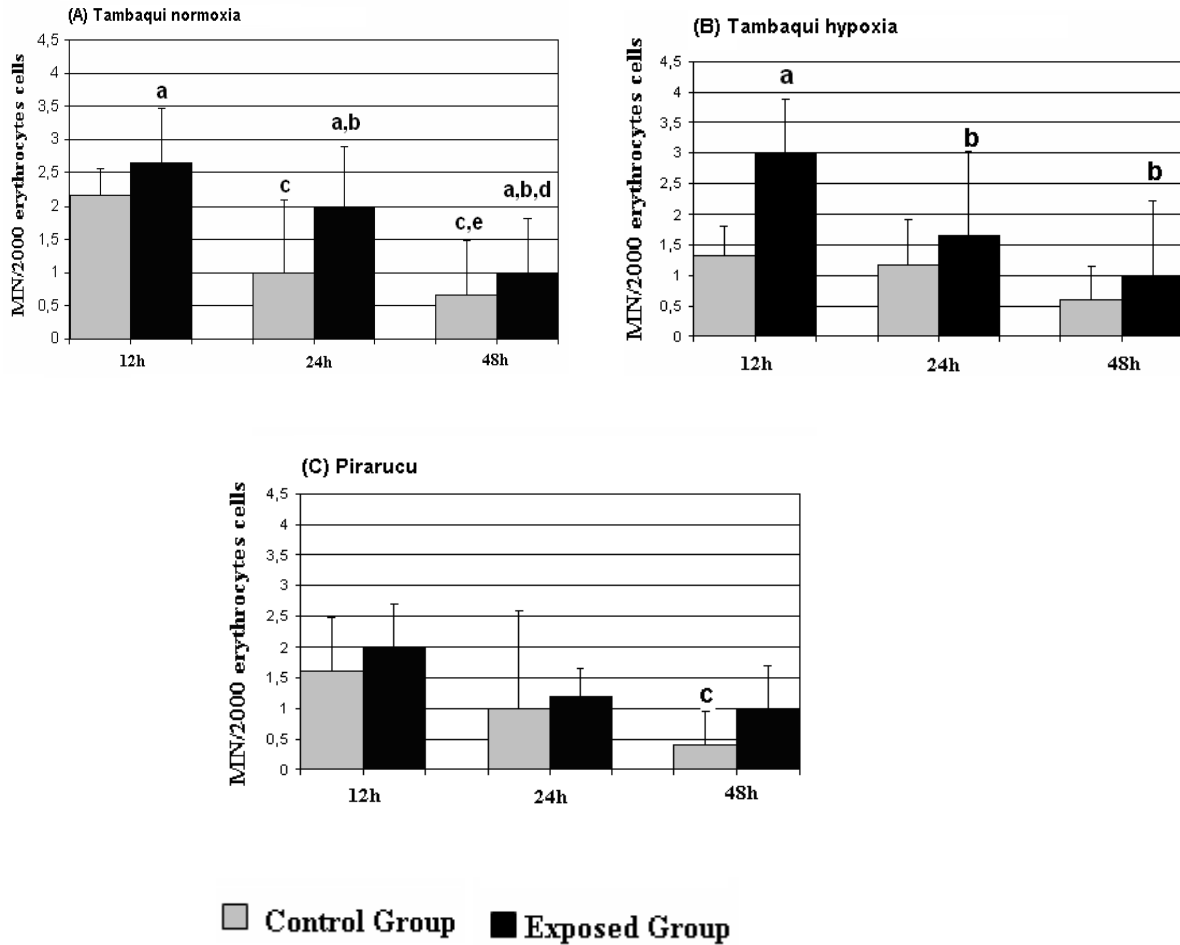
Figure 4 presents repair results observed by Comet assay. All groups –, tambaqui under normoxia and hypoxia, and pirarucu –, showed significant damage increase 12h after UVR exposure cessation as compared to the non-exposed controls ( $P<0.01$ ). When different periods UV cessation were compared, tambaqui and pirarucu UV-exposed groups presented significant damage reduction 24 and 48h as compared to 12h ( $P<0.01$ ). DNA damage was also reduced in non-exposed control groups.



**Figure 4.** Damage Index means and standard deviations (Comet assay) of different sampling schedules after the completion of UV exposure for 4h (repair). (A) tambaqui under normoxia; (B) tambaqui under hypoxia; (C) pirarucu. <sup>a</sup>Significant at  $P<0.01$  in relation to the control group of same group; <sup>b</sup>Significant at  $P<0.01$  in relation to UV 12h; <sup>c</sup>Significant at  $P<0.01$  in relation to Control 12h; <sup>d</sup>Significant at  $P<0.01$  in relation to UV 24h; <sup>e</sup>Significant at  $P<0.01$  in relation to control 24h; ANOVA, Dunnet's test.

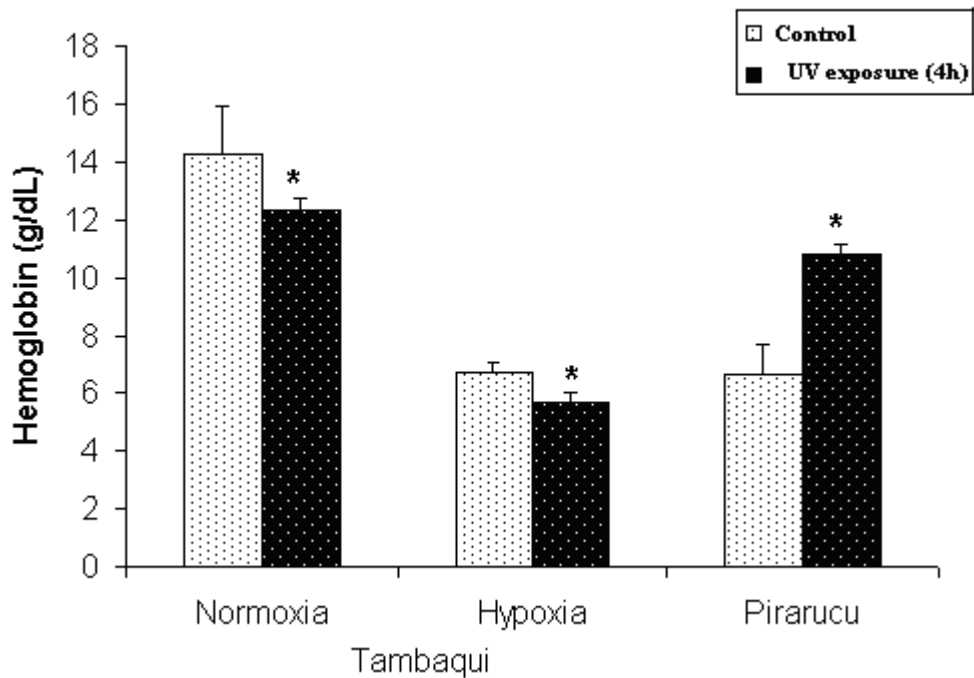


MN test results after UV exposure ceased (Figure 5) show that all groups presented micronucleated-cell reduction, but only in exposed tambaqui under hypoxia this reduction was significant after 24h and 48h as compared to 12h. In relation to control groups, a significant reduction was also observed in tambaqui under normoxia and pirarucu.



**Figure 5.** Micronucleated cell means and standard deviations of different sampling times after completion of 4h UV exposure (repair). (A) tambaqui under normoxia; (B) tambaqui under hypoxia; (C) pirarucu. <sup>a</sup>Significant at P<0.01 in relation to the control group of same group; <sup>b</sup>Significant at P<0.01 in relation to UV 12h; <sup>c</sup>Significant at P<0.01 in relation to Control 12h; <sup>d</sup>Significant at P<0.01 in relation to UV 24h; <sup>e</sup>Significant at P<0.01 in relation to control 24h; ANOVA, Dunnet's test.

The hemoglobin levels (mean  $\pm$  S.D.) of tambaqui under normoxia and hypoxia, and pirarucu are presented in Figure 6. Mean hemoglobin levels were different between UV-exposed groups and controls, and between normoxia and hypoxia ( $P < 0.05$ , *t*-Student).



**Figure 6.** Mean hemoglobin values of tambaqui under normoxia and hypoxia, and pirarucu. \*  $P < 0.05$ , *t*-Student.

#### 4. DISCUSSION

Little attention has been given to the impact of increased ultraviolet radiation on neotropical fishes. The increasing levels of ultraviolet radiation expected for the next century may affect the biodiversity and/or the structure of fish populations in the Amazon Region. Therefore, the knowledge on the response of fish species, such as tambaqui and pirarucu, to UV exposure can help conservation actions in this Region.

As expected, the present study demonstrated UVR-induced DNA damage, as detected by Comet assay, in the neotropical fishes *C. macropomum* (tambaqui) and *A. gigas* (pirarucu). In addition, tambaqui was exposed for different periods to UVR, and showed a clear dose-response damage intensity to exposure time and, both under normoxia and hypoxia oxygen conditions. Our results also showed that, when submitted to hypoxia, tambaqui presented higher DNA damage than under normoxia, despite the lack of significant difference.

The increase of DNA damage observed in tambaqui under hypoxia may be associated with ROS. Under severe hypoxia, the gradual reduction of electrons in the mitochondrial chain may result in an uncontrolled formation of ROS, with consequent shifts in cellular redox potential (Chandel and Shumacker, 2000, as reviewed by Sampaio et al., 2008). Like all aerobic organisms, fish are also susceptible to ROS effects, and have inherent and effective antioxidant defenses (Martínez-Álvarez et al., 2005; Sampaio et al., 2008).

This result is consistent with our hematology results, in which a hemoglobin reduction was observed in tambaqui under hypoxia. Recent studies indicate that radiation promotes changes in the morphology of red blood cells and hemoglobin oxidation (methemoglobin formation). The exposure of human erythrocytes to ionizing radiation induces hemoglobin damage (Krokosz et. al, 2007), and may lead to anemia (Cuturilo et al., 2008) through hemoglobin oxidation (Fonseca and Paquini, 2002). A study reported that Antarctica fish, probably due to environmental adaptations to cold and increased exposure to radiation, showed reduced levels of erythrocytes and hemoglobin (Vitagliano et al., 2004). Hemoglobin/methemoglobin ratio and cell shape, which are crucial for cell function and survival, are irreversibly disrupted. Thus, *in vivo*, these cells will be removed early from the

circulation, decreasing hemoglobin content in individuals exposed to radiation. Hemoglobin provides a good estimation of fish exposure to UVR, and can be used together with genotoxicity tests.

The damage caused by ROS is recognized by DNA glycosylases, AP endonucleases of the excision repair bases (BER) mechanism, and, in some cases, especially by nucleotide excision repair (NER) machinery leading to DNA single strand breaks (Berra and Menck, 2006), that are more rapidly repaired (Silva et al., 2000). This is in agreement with our repair results, where all fish groups showed repair after 24h (Comet assay), with an approximate 3-fold reduction 24h after exposure.

The damage increase observed in control groups in relation to T0 was probably caused by fish activity, which changed after beginning of the experiments. In this sense, Hartmann et al. (1994) reported physical exercise-induced DNA damage and oxidative stress, suggesting that the activity of DNA repair enzymes contributed to damage level, mainly due to transient DNA single strand breaks formed during excision repair. This is similar to our results, where we observed that fishes in the beginning of the study presented maximum 10% of damaged cells, whereas after the experiments began, this percentage increased at least two times. After fish manipulation ceased, this increase quickly vanished, as observed by a rapid reduction in DNA damage by Comet assay.

In terms of damage classes, Comet assay results yielded class 4 rates above 10% for tambaqui, under both oxygen conditions, as well as for pirarucu. The worst condition was observed under hypoxia and normoxia at 4h ( $120.96 \text{ J/cm}^2 \text{ UVA} + 259.20 \text{ J/cm}^2 \text{ UVB}$  doses) of exposure, with 31% and 18% of class 4 damage, respectively. The occurrence of comets with no heads and with nearly all DNA in the tail (class 4) has been described as the most obvious aspect of apoptotic cells in Comet assay, and apoptotic DNA fragmentation is characterized by the generation of DNA double strand breaks (Farbairn et al., 1995; Hartman and Speit, 1995; Silva et al., 2000). With respect to our class 4 damaged cells results, the observed damage is probably the result of byproducts of the repair system. Different studies demonstrated double strand breaks induced by UV exposure related to repair mechanisms (Shinohara and Ogawa 1995; Sinha and Häder, 2002; Rapp and Greulich, 2004).

The main initial event of UVB exposure is radiation absorption by DNA, resulting in the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (Sinha and Häder 2002; Cadet et al., 2005), which are responsible for the formation of Dewar valence isomers (Vincent and Neale, 2000). UVA can also generate CPDs at very low induction rates, and produces indirect damage through oxygen and hydroxyl radicals (Davies and Truscott, 2001; Cadet et al., 2005), highly reactive chemical intermediates (Peak and Peak, 1990), which react with DNA to form monomeric damage (photohydrates), strand breaks, and DNA crosslinks (Mitchell and Karentz, 1993). DNA damage repair usually occurs through two main mechanisms: (1) photoenzymatic repair (PER), which involves the direct monomerization of CPDs by DNA photolyase in the presence of light, particularly UVA and short wavelength visible light; and (2) nucleotide excision repair (NER), a general DNA repair mechanism acting both on CPDs and the (6-4) photoproducts. As NER does not require light, it is also known as dark repair, and it is present in all organisms (Sinha and Häder 2002; Cadet et al., 2005; Dong et al., 2007). Here we suggest that fishes have a competent NER system because they were kept in the dark in the period between the end of the UV treatment and removal from the tanks. Therefore, the excision repair system possibly involved was the “dark repair” or base excision (BER) pathway. BER has probably evolved to protect cells from DNA damage induced by hydrolysis, ROS or other intracellular metabolites, and it is also important in repairing DNA damage caused by ionizing radiation and strong alkylating agents (Seeberg et al., 1995).

The frequency of micronucleated cells observed in tambaqui, both under normoxia and hypoxia, was significantly higher than that of the control group. MN detects non-repairable damages, such as clastogenic and aneugenic lesions, whereas Comet assay detects recent lesions that can be repaired, such as breaks and alkali-labile sites (Klobucar et al., 2003). Comet assay generally is more sensitive than the MN test to assess DNA damage. When micronucleus test and Comet assay were carried out with different fish species exposed to a number of genotoxicants, the results indicated that the micronucleus test was much less sensitive than the Comet assay (Petras et al., 1995; Mitchelmore and Chipman, 1998; Meier et al., 2002; Andrade et al., 2004; Vanzella et al., 2007). However, in the present study, a relation

between MN test and Comet assay results was demonstrated, with the same groups that presented significant increase in comet cells also showing an increase in micronucleated cells. Tambaqui under both oxygen conditions showed higher than 10% class-4 damage, and due to its relation with double strand breaks, it was possible to observe induction of micronucleus. Double strand breaks are known to cause damages difficult to repair (Hartmann and Speit, 1995; Silva et al., 2000), and may induce chromosome lesions, and consequently MN formation (Thomas et al., 2003). Similar to our results, several authors demonstrated difficult-to-repair DNA damages in fish cells, generating chromosomal aberrations and/or tumors (Natarajan et al., 1980; Vetter et al., 1999; Zagarese and Williamson, 2001; Armstrong et al., 2002; Ciereszko et al., 2005).

Our results also showed a significant difference between tambaqui and pirarucu. Tambaqui, both under normoxia and hypoxia, showed higher sensitivity to UVR than pirarucu, as detected both by Comet assay and MN test. In addition, Tambaqui baseline DNA damage was statistically higher than that observed in pirarucu.

This difference between species may be explained by characteristics of their evolutionary background. The Amazon basin is characterized by periodical pulses of flooding, during which water levels rise up to 13 meters. During the high water level season, extensive areas are flooded and covered by macrophytes. In these so-called *várzeas* (flooded areas), dramatic environmental changes in oxygen availability are observed during a single day. In order to survive under low oxygen tension at high temperatures, Amazonian fish have developed several strategies to cope with these constraints. Pirarucu is found throughout the Amazon Basin, representing a true witness of the evolution of life in the region (Nelson, 1984). Tambaqui, a more modern Actinopterigeo than pirarucu, may show a poorer adaptive capacity than that primitive species in relation to UVR. Furthermore, when we compared both species during UV exposure, pirarucu came to the surface every 5 minutes to breathe, and may immerse for 10 minutes with no access to air (Val et al., 2004), whereas tambaqui expands the lower lips to funnel the water surface, which is naturally more oxygenated, across the gills (Val, 1995). The low availability of dissolved oxygen in water is one of the more stressful environmental factors for aquatic animals, and requires adaptive adjustments (reviewed by Val

and Almeida-Val, 1999; Almeida-Val et al., 2006). In addition to respiration strategies, the skin of fish is modified to cope with UV exposure. UVA-induced DNA damage is involved in skin carcinogenesis, and may have consequences for photoprotection strategies (Mouret et al., 2006).

Pirarucu has some features that can protect it from UVR-induced damage as compared to tambaqui. For instance, pirarucu scale is thicker than that of tambaqui, and present sedentary habits (Barthem and Goulding, 1997). We have previously shown that fish activity influences Comet assay results. Andrade et al. (2004) demonstrated similar results with sea catfish, which are sediment-feeders and presented lower DNA damage than mullets, which prefer superficial waters; these preferences were related with activity.

An important objective of UV biologists is to be able to predict the effects of changes in UV exposure on all aquatic organisms and processes (Zagarese and Williamson, 2001). Tambaqui and pirarucu fishes live in the Amazon basin, close to the Equator, therefore exposed to higher ultraviolet radiation intensity. Our study demonstrated that UV caused DNA damage, as detected by Comet assay, in both fish species, as well as differences between these two species in terms of genotoxicity response, possibly due to their distinct evolutionary histories. Finally, the results of our study indicated that alkaline Comet assay is more sensitive than MN assay for detecting genotoxicity caused by UV exposure, particularly because the main observed damage was single strand breaks, probably induced by ROS. Moreover, this study suggested that the repair systems involved were BER and NER under the conditions of the experiment, and that tambaqui and pirarucu are useful sentinel organisms, presenting adequate sensitivity to be used as monitors of UVR-related biological hazards in the Amazon region.

## 5. Acknowledgments

The authors want to express their gratitude to Prof. Vera Maria Fonseca Almeida-Val for her continuous support, and to M. Sc. Maria de Nazaré Paula da Silva and Luiza Cristina Maia Pinheiro for their help during the lab work in Manaus. We also thank Dr. Renato Moreira Rosa (Departmento of Biophysics, UFRGS) for his valuable comments and suggestions. This work was financially supported by CNPq, FAPEAM, PRONEX, and ULBRA.

## 6. References

- Almeida-Val, V.M.F., Chippari Gomes, A.R., Lopes, N.P., 2006. Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon. In *The Physiology of Tropical Fishes*. 21, 443-499.
- Al-Sabti, K.; Metcalfe, C.D. (1995): Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Res.* 343: 121-135.
- Andrade, V., Freitas, T.R.O., Silva, J, 2004. Comet assay using mullet and sea cat fish erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research-Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 560, 57-67.
- Armstrong T., Reimschuessel, R., Bradley, B. 2002. DNA damage, histological changes and DNA repair in larval Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to ultraviolet-B radiation. *Aquatic Toxicology* 58, 1-14.
- Berra, M.C., Menck, C.F.M., 2006. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quím. Nova* 29,1340-1344.
- Cade, J., Sage, E., Douki, T., 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research* 571, 3–17.
- Chandel, N.S., Shumacker, P.T., 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J. Appl. Physiol.* 88, 1880–1889.
- Cierieszko, A., Wolfe, T.D., Dabrowski, K., 2005. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquatic Toxicology* 73, 128–138.
- Cuturilo, G., Skoric, D., Grkovic, S.M., Bojic, V., Rodic, P., Stefanovic I., 2008. Aplastic anemia and Turner syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 180, 158-159
- Davies, M.J., Truscott, R.J., 2001. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J. Photochem. Photobiol.* 63: 114–125.



- Dong, Q., Svoboda, K., Terrence R.T., Monroe W.T., 2007. Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: Evidence for a competent photorepair system. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 88, 137–146.
- Farbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mut. Res.* 339, 37-59.
- Farman, J.C., Gardiner, B.G., Shanklin, J.D., 1985. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub>/NO<sub>x</sub> interaction. *Nature*, 315, 207-210.
- Fonseca, T.C.C., Paquini, R., 2002. Anemia aplástica severa: Análise dos pacientes pediátricos atendidos pelo serviço de transplante de medula óssea do hospital de clínicas de Curitiba no período de 1979-1993. *Rev. Assoc. Med. Bras.* vol.48 no.3
- Gambichler T., Schlaffke, A., Nordwig, S.T., Othlinghaus, N., Altmeyer, P., Kreuter, A., 2008. Tacrolimus ointment neither blocks ultraviolet B nor affects expression of thymine dimmers and p53 in human skin. *Journal of Dermatological Science* 2-8.
- Häder, D-P. 2003. Effects of solar ultraviolet radiation on aquatic primary producers in *Handbook of Photochemistry and Photobiology: Photobiology*, vol. 4, ed. H. S. Nalwa, American Scientific Publishers, California, USA, pp. 329–352.
- Häder, D.P.; Kumar, H.D.; Smith, R.C.; Worrest, R.C. 2003. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemical and Photobiological Science* 2, 39-50.
- Häder, D-P., Sinha, R.P., 2005. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutation Research* 571, 221–233.
- Häder, D-P., Kumar, H.D., Smith, R.C., and Worrest, R. C., 2007. Effects of solar UVR on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 267–285.
- Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grünert-Fuchs, M., Speit, G., 1994. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9, 269-272.
- Hartmann, A., Speit, G., 1995. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mut. Res.* 346, 49-56.
- Huovinen, P.S., Penttila, H., Soimasuo, M.R., 2000. Penetration of UVR into Finnish lakes with different characteristics. *J. Circumpolar Health* 59, 15–21.
- Klobucar, G.I.V.M., Pavlica, M., Erben, R., Papes, D., 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquat. Toxicol.* 64, 15–23.
- Krokosz, A., Komorowska, M.A., Szweda-Lewandowska, Z., 2007. Radiation damage to human erythrocytes. Relative contribution of hydroxyl and chloride radicals in N<sub>2</sub>O-saturated buffers. *Radiation Physics and Chemistry*, In Press, Corrected Proof, Available online 22 November.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Fish Biol.* 15.
- Meier, J.R., Chang, L.W., Franson, S.E., Daniel, B., Toth, G., Lazorchak, J., Wernsing, P., 2002. Assessment of genetic damage indicators in fish in laboratory, mesocosm, and watershed studies, Abstracts of the 23rd Annual Meeting of the Society of Environmental

- Toxicology and Chemistry, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, 2002, p. 29.
- Mitchell, D.L., Karentz D., 1993. The induction and repair of photodamage in the environment. *Environmental UV Photobiology* (Edited by A. R. Young, L. O. Bjorn, J. Moan and W. Nultsh), 345–377.
- Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in the environmental monitoring, *Mutat. Res.* 399, 135–147.
- Minissi, S., Ciccotti, E., Rizzoni, M., 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutat Res* 367, 245-251.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., Douki, T., 2006. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *PNAS* 103, 13765–13770.
- Natarajan, A.T., Obe, G., Van Zeeland, A.A., Palitti, F., Meijers, M. Verdegaal- Immerzeel, E.A.M., 1980. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. II. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 69, 293–305.
- Nelson, J.S., 1984. *Fishes of the World*. A Wiley-Interscience Publication, New York, 521p.
- Olson, M.H., Mitchell, D.L., 2006. Interspecific variation in UV defense mechanisms among temperate freshwater fishes. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 606–610.
- Peak, M.J., Peak, J.G., 1990. Hydroxyl radical quenching agents protect against DNA breakage caused by both 365-nm and gamma radiation. *Photochem. Photobiol.* 51: 649–652.
- Petras, M., Vrzoc, M., Pandrangi, R., Ralph, S., Perry, K., 1995. Biological monitoring of environmental genotoxicity in southwestern Ontario, in: F.M. Butterworth, L.D. Corkum, Pfeifer, G.P., Youl, Y.H., Besaratinia, A., 2005. Mutations induced by ultraviolet light *Mutation Research* 571, 19–31.
- Rapp, A., Greulich, K.O., 2004. After double - strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *Journal of Cell Science* 117, 4935-4945.
- Salo, H.; Jokinen, E.; Markkula, S.; Aaltonen, T.; Pentttilä, H. 2000. Comparative effects of UVA and UVB irradiation on the immune system of fish. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 56B: 154-162.
- Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.N., Tadeu, F., 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and ombined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147: 43–51.
- Silva J, Freitas TRO, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B. 2000a. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 35: 270-278.
- Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. 2000b. An alkaline single-cell gel eletrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol*, 23: 241-245.

- Seeberg, E., Eide, L., Bjoras, M., 1995. The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.* 20, 391-397.
- Sinha, P.R., Häder, D.P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 225 – 236.
- Shinohara, A., Ogawa, T., 1995. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends Biochem. Sci.* 20, 387-391.
- Tedetti, M., Sempéré, R., 2006. Penetration of Ultraviolet Radiation in the Marine Environment. A Review. *Photochemistry and Photobiology.* 82, 389–397.
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu J- C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206- 221.
- Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M., 2003. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis* 18, 187–194.
- Val, A.L., 1995. Oxygen transfer in fish: Morphological and molecular adjustments. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28, 1119-1127.
- Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 1999. *Biology of Tropical Fishes*. Manaus: INPA, 1999. v. 1. 460 p.
- Val, A.L., Castro-Pérez, C.A., Almeida-Val, V.M.F., 2004. UV: an environmental challenge for fish of the Amazon. In: VI International Congress on Biology of Fishes, 2004, Manaus. *Advances in Fish Biology*. Vancouver: American Fisheries Society - Physiology Section 1, 1-5.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research* 631, 36–43.
- Vetter, R.D., Kurtzman, A., Mori, T., 1999. Diel cycle of DNA damage and repair in eggs and larvae of North-ern anchovy. *Engraulis mordax*, exposed to solar ultraviolet radiation. *Photochem. and Photobiol.* 69, 27-33.
- Vink, A.A., Roza, L., 2001. Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers, *J. Photochem. Photobiol. B.* 65, 101–104.
- Vincent, W.F., Neale, P.J., 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. *The Effects of UVR in the Marine Environment* (Edited by S. de Mora, S. Demers and M. Vernet), pp. 149–176. Cambridge University Press, New York.
- Vitagliano, L., Bonomi, G., Riccio, A., Prisco, G., Smulevich, G., Mazzarella, L., 2004. The oxidation process of Antarctic fish hemoglobins. *Eur. J. Biochem.* 271, 1651–1659.
- Zagarese, H.E., Williamson, C.E., 2001. The implications of solar UVR exposure for fish and fisheries. *Fish and Fisheries* 2, 250–260.
- Wojcik, A., Bochenek, A., Lankoff, A., Lisowska, H., Padjas, A., Szumiel, I., Sonntag, C.V., Obe, G., 2006. DNA interstrand crosslinks are induced in cells prelabelled with 5-bromo-20-deoxyuridine and exposed to UVC radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 84, 15–20.

## 4. DISCUSSÃO

Durante os últimos 20 anos, foi observada uma redução gradual da espessura da camada de ozônio, principalmente nas latitudes médias e altas, atribuída à liberação de compostos químicos resultantes das atividades humanas.

A Amazônia está localizada na região equatorial, e por isso tende a receber uma maior quantidade de radiação UV. A atual conjuntura da Amazônia é muito preocupante, principalmente quanto ao desmatamento, sendo que a falta de cobertura vegetal contribui para a maior incidência dos raios UV sobre os peixes. O desflorestamento provoca o assoreamento dos rios, o que diminui o tamanho da coluna d'água, deixando assim os peixes mais expostos à superfície. Além disso, variações drásticas no suprimento de oxigênio dissolvido são eventos comuns nas águas da Amazônia. Para sobreviver a estas variações, os peixes, incluindo o tambaqui e o pirarucu, desenvolveram muitos mecanismos adaptativos para tomar oxigênio diretamente do ar ou da camada superficial da coluna d'água, naturalmente mais oxigenada, ficando assim mais expostos à radiação UV. As radiações UVB e UVA penetram profundamente na coluna de água (muitos metros) e, portanto, podem afetar os ecossistemas aquáticos (HÄDER *et al.*, 2007). No presente trabalho, buscou-se: (a) avaliar o efeito genotóxico e mutagênico da radiação ultravioleta em duas espécies de peixes da ictiofauna tropical, o pirarucu e o tambaqui, um de respiração aérea obrigatória e outro de respiração aérea facultativa, respectivamente, e ambos de grande importância para a piscicultura; (b) conhecer a interação dos dois tipos de estresse: a hipóxia e a exposição à radiação UV. O efeito genotóxico foi avaliado pelo ensaio cometa, versão alcalina, e efeito mutagênico pelo teste de micronúcleos.

O Ensaio Cometa detecta danos primários no DNA: quebras simples, ou duplas, na fita de DNA e lesões alcalilábeis e tem sido largamente utilizado para detectar efeitos genotóxicos da radiação UV (SASTRE *et al.*, 2001; JANTSCHITSCH & TRAUTINGER, 2003; WOJCIK *et al.*, 2006). Desta forma, o Ensaio Cometa foi padronizado para eritrócitos de tambaqui e pirarucu e utilizado como biomarcador neste estudo.

Nossos dados mostraram um aumento de danos ao DNA quando o tambaqui foi exposto a diferentes doses de radiação UV, demonstrando uma clara dose-resposta. Foi também observado um aumento de danos para os grupos controles (sem exposição à radiação UV) em relação ao nível basal (T0, tempo zero, início do experimento). Os danos aumentaram pelo menos duas vezes em relação ao T0 após a manipulação dos animais. Este aumento provavelmente tenha sido provocado pela atividade física dos peixes dentro dos tanques experimentais, o que pode ter levado a estresse oxidativo e conseqüentemente a danos no DNA. Nesta direção, Hartmann *et al.* (1994) realizaram um estudo utilizando humanos e fazendo uma relação entre exercício físico, estresse oxidativo e danos no DNA.

Para o tambaqui, quando exposto a hipóxia, embora tenha apresentado um aumento de danos ao DNA, diferenças não foram significativas em comparação com o grupo normóxia. Em animais aquáticos, diversas condições podem induzir estresse oxidativo. Por exemplo, sob hipóxia ocorre uma redução gradual nos elétrons na cadeia mitocondrial, resultando na formação de EROs (CHANDEL and SHUMACKER, 2000, revisado por SAMPAIO *et al.*, 2008). Corroborando este resultado, observou-se uma redução da hemoglobina, que reforça a hipótese da ação de EROs. Além disso, recentemente, Fonseca & Paquini (2002) observaram que a radiação ionizante provoca a oxidação da hemoglobina, levando a uma doença chamada anemia aplástica.

Os danos de bases causados por ERO são reconhecidos por DNA glicosilases, AP endonucleases do mecanismo de reparação por excisão de bases (BER) e, em alguns casos, especialmente pelo sistema de reparação por excisão de nucleotídeos (NER), levando principalmente a quebras simples de DNA (BERRA & MENCK, 2006), as quais são mais rapidamente reparadas (SILVA *et al.*, 2000). Isto está em concordância com os nossos resultados de reparo, em que todos os grupos demonstraram reparação após 24h (Ensaio Cometa), com uma redução de cerca de três vezes após 24h de sem exposição.

Em relação às classes de danos do EC (de acordo com o tamanho da cauda: sem danos – classe 0 até danos máximos – classe 4), nossos resultados mostraram que, na dose máxima de radiação UV (120.96 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259.20 J/cm<sup>2</sup> UVB), o tambaqui em normóxia e hipóxia apresentou respectivamente 31% e 18 %. A ocorrência de classe 4 tem sido descrito como

evidência de apoptose celular e/ou de quebra dupla de DNA (FARBAIRN *et al.*, 1995; HARTMAN & SPEIT, 1995; SILVA *et al.*, 2000).

Apesar de mutações genéticas serem de extrema importância para a evolução de uma espécie, a sobrevivência do indivíduo depende da estabilidade do seu genoma (ALBERTS *et al.*, 2002). A evolução se encarregou de selecionar diferentes estratégias para minimizar os efeitos deletérios das lesões induzidas no DNA incluindo mecanismos que reparam os danos. Os peixes, neste estudo, ficaram no escuro após a exposição à radiação UV até que fossem removidos dos tanques para a coleta das amostras de sangue. Assim, pode-se afirmar que não houve fotorestauração e o sistema de reparação que pode ser considerado é reparo por excisão de bases (BER) ou reparo por excisão de nucleotídeos (NER).

Os resultados apresentados para o Teste de MN em *Collossoma macropomum* (tambaqui) e *Arapaima gigas* (pirarucu), após a exposição à radiação UV, mostraram que não houve diferenças significativas entre as doses. Para o *C. macropomum*, porém, mesmo não apresentando diferença significativa entre as doses para a dose máxima de UV (120.96 J/cm<sup>2</sup> UVA + 259.20 J/cm<sup>2</sup> UVB) é constatado um tênue aumento na frequência de MNs em relação ao seu grupo controle. Em trabalho de avaliação comparando as duas técnicas de MN e EC para detectar efeitos genotóxicos da radiação de Raios-X, He *et al.* (2000) encontraram maior sensibilidade para avaliação de dano no DNA para o EC que para o Teste MN. Nosso estudo demonstrou a relação entre os resultados do MN e EC, onde a dose maior para ambos os peixes apresentaram aumento superior a 10% de classe 4, possivelmente levando à dupla quebra de DNA, onde foi possível observar a indução de micronúcleos. O teste de MN detecta danos não reparáveis como clastogênicos e aneugênicos. Quebra dupla de DNA é um dano conhecido como de difícil reparação (HARTMANN & SPEIT, 1995; SILVA *et al.*, 2000) e pode induzir lesões nos cromossomos e, assim, formação de micronúcleos (THOMAS *et al.*, 2003).

Quando comparadas as duas espécies, o tambaqui apresentou um nível basal de danos ao DNA estatisticamente maior que o pirarucu, mostrando que o pirarucu parece ser mais adaptado à radiação UV. Esta diferença entre as espécies pode ser explicada pelos processos de evolução. O pirarucu é uma espécie do Holoceno recente, verdadeiro documento da evolução; é, às vezes, chamado de fóssil vivo devido a sua morfologia arcaica. Considerados um dos elos

entre o mundo primitivo e a idade atual, apresentam características peculiares que os diferenciam dos demais actinopterígeos (FONTENELLE, 1948; SANTOS & MOURA, 2002). O tambaqui é mais atual e pode ter uma capacidade adaptativa menos eficiente em relação à radiação UV. Além disso, as duas espécies apresentam estratégias respiratórias diferentes, o pirarucu fica mais exposto à radiação UV que o tambaqui, pois é obrigado a sair para a superfície para respirar a cada 15 minutos (MENEZES, 1951).

Foi demonstrado neste estudo um aumento nos danos ao DNA das duas espécies de peixes da ictiofauna tropical induzido pela radiação ultravioleta. Considerando que o efeito da radiação UV é cumulativo, é possível que os animais mais velhos, por terem se exposto por um tempo maior na superfície da coluna d'água, apresentem danos epiteliais mais extensos. Trata-se de uma importante informação que poderá ter aplicação imediata no manejo dessas espécies, otimizando a criação destes peixes em tanques de rede.

Concluindo, a versão alcalina do Ensaio Cometa e o Teste de Micronúcleos demonstraram-se complementares para o estudo em questão, o que acarreta uma classificação de diferentes "*end points*" de avaliação genotóxica, ressaltando a importância de manter uma combinação de testes para melhor discernimento da mutagenicidade e genotoxicidade causada pela exposição à radiação UV. O conjunto destes resultados nos levam a sugerir que os mecanismos de reparo envolvidos neste estudo sejam o BER e o NER. Finalmente, o tambaqui e o pirarucu revelaram-se excelentes organismos-sentinela, mostrando sensibilidade suficiente para tornarem-se monitores efetivos de riscos biológicos na região Amazônica.

## 5. CONCLUSÕES

A avaliação do efeito genotóxico da radiação UV sobre peixes da Amazônia é uma importante forma de determinar os efetivos de risco biológico na região. A padronização de organismos monitores para a região e a avaliação do efeito genotóxico e mutagênico da radiação UVA e UVB em *C. macropomum* (tambaqui) and *A. Gigas* (pirarucu) permitiram concluir que:

- a) A aplicação do ensaio cometa e do teste de micronúcleos no sangue periférico do *C. macropomum* e *A. gigas* mostraram-se “*end points*” confiáveis na avaliação da genotoxicidade e da mutagenicidade.
- b) As duas espécies, *C. macropomum* e *A. gigas*, mostraram-se organismos com potencial para monitoramento da genotoxicidade na região Amazônica, sendo sensíveis aos danos causados pela UVA e UVB.
- c) A radiação UVA e UVB causaram genotoxicidade para as duas espécies, *C. macropomum* e *A. gigas*, detectada pelo Ensaio Cometa.
- d) Diferentes doses (tempos de exposição) de UVA e UVB levaram a diferentes respostas genotóxicas no tambaqui, sendo que, quanto maiores as doses, maior a quantidade de danos de DNA, tanto em normóxia como em hipóxia (dose resposta).
- e) A formação de classe 4 (tipo de dano ao DNA observado pelo Ensaio Cometa), principalmente para o tambaqui em hipóxia 4h, provavelmente seja um produto secundário do reparo celular.
- f) O tambaqui em hipóxia apresentou maiores índices de danos ao DNA que em normóxia, provavelmente associado às espécies reativas de oxigênio.



g) O tabaqui e o pirarucu demonstraram uma redução de cerca de três vezes nos danos de DNA (Ensaio Cometa) após ter cessado a exposição a UV por 24h, demonstrando reparo celular.

h) O conjunto dos resultados nos leva a sugerir que os mecanismos de reparo envolvido neste estudo foram o BER e o NER

i) A exposição à radiação UVA e UVB, nas condições deste estudo, não foi capaz de induzir mutagenicidade nas células do pirarucu (Teste de Micronúcleos).

j) O aumento na frequência de micronúcleos para o tabaqui na dose máxima, tanto normóxia como em hipóxia, demonstrou a mutagenicidade da UVA e UVB em altas doses. A formação de micronúcleos está associada aos danos não reparados, bem como à observação de Classe 4 no Ensaio Cometa.

k) O tabaqui apresentou-se mais sensível que o pirarucu quanto à formação de danos celulares para ambos os testes, Ensaio Cometa e Micronúcleo, o que se deve provavelmente ao histórico evolutivo destas espécies na região Amazônica. O tabaqui é mais atual e pode ter uma capacidade adaptativa menos eficiente em relação à radiação UV. Além disso, apresentam estratégias respiratórias diferentes, sendo que o pirarucu fica mais exposto à radiação UV que o tabaqui.

## 6. PERSPECTIVAS

Para se obter mais informações sobre os danos causados pela radiação ultravioleta em peixes, seria de grande importância:

- avaliar os efeitos da radiação em espécies de peixes com diferentes hábitos de respiração, bem como em diferentes fases de vida;
- avaliar o efeito da radiação em zooplâncton, que serve de alimento para esses peixes;
- avaliar o possível papel protetor da vitamina C na minimização dos efeitos da exposição à radiação ultravioleta;
- produzir uma cartilha contendo informações básicas sobre esta radiação para distribuição aos criadores de peixes em geral.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akcha F.; Hubert, F.V.; Pfol-Leszkowicz, A. (2003): Potential value of the comet assay and DNA adduct of in situ exposure to genotóxico compounds. *Mutation Res.* 534: 21-32.
- Al-Sabti, K. (1995): An vivo binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutation Res.* 335: 109-120.
- Al-Sabti, K.; Metcalfe, C.D. (1995): Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Res.* 343: 121-135.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (1989): Cell growth and division. *Molecular Biology of the Cell* (Garland Publishing, eds.). London, pp. 727-790.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002): *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition, New York: Garland Science.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. (1995): Adaptação de peixes aos ambientes de criação. In: Val, A.L. & Honczarynk, A. (Eds). *Criando Peixes na Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. p. 45-59.
- Andrade, V.M.; Silva, J.; Rabaioli, F.; Heuser, V.D.; Johnny, F.D.; Yoneama, M.L.; Freitas, T.R.O. (2004a): Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and Micronucleus test. *Environmental Molecular Mutagenesis* 44: 459-468.
- Andrade, V.M.; Freitas, T.R.O.; Silva, J. (2004b): Comet assay using mullet (*Mugil sp*) and sea catfish (*Netuma sp*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Res.* 560: 57-67.
- Anwar, M.F.; Moustafa, M. (2001): The effect of melatonin on eye lens of rats exposed to ultraviolet radiation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129: 57-63.
- Araújo-Lima, C.A.; Goulding, M. (1998): Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá. Brasília-CNPq, Tefé, Amazonas. 186p.
- Araújo, J.O.; Lopes, Jr.H.O.; Brust, S.M.A.; Pinto, L.R. (2005): Alterações hematológicas em juvenis de tambaqui expostos ao petróleo e ao dispersante. In: 1º Congresso Internacional PIATAM, Manaus. Integridade Biótica na Amazônia.
- Aride, P.H.R.; Roubach, R.; Val, A.L. (2007): Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research* 38: 588-594.
- Armstrong, T.; Reimschuessel, R.; Bradley, B. (2002): DNA damage, histological changes and DNA repair in larval Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to ultraviolet-B radiation. *Aquatic Toxicology* 58: 1-14.
- Asanami, S.; Shimono, K.; Sawamoto, O.; Kurisu, K.; Uejima, M. (1995): The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. *Mutation Res.* 347: 73-78.
- Ayllon, F.; Suciú, R.; Gephard, S.; Juanes, F.; Garcia-Vazquez, E. (2000): Conventional armament wastes induce micronuclei in wild Brown trout *Salmo trutta*. *Mutation Res.* 470: 169-176.
- Berra, M.C.; Menck, C.F.M. (2006): Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quím. Nova* 29:1340-1344.

- Bombail, V.; Aw, D. Gordon, E.; Batty, J. (2001): Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Poholis gunnelus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44: 383-392.
- Braum, E.; Junk, W.J. (1982): Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. *Int. Ver. Ges. Hydrobiol* 67: 869-886.
- Brust, S.M.A.; Pinto, L.R. (2005): Efeitos do petróleo e do dispersante químico em juvenis de tambaqui. In: 1º Congresso Internacional PIATAM - Ambiente, Homem, Gás e Petróleo, 2005, Manaus. *Integridade Biótica na Amazônia*.
- Bücker, A.; Souza, M.C.; Alves-Gomes, J.A. (2005): Indução de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em *Apteronotus bonapartii* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. In: 1º Congresso Internacional do PIATAM 1:190.
- Cadet, J.; Sage, E.; Douki, T. (2005): Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research* 571, 3–17.
- Caldwell, M.; Björn, L.; Bornman, J.; Flint, S.; Kulandaivelu, G.; Teramura, A.; Tevini, M. (1998): Effects of increased solar ultraviolet on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 46B: 40-52.
- Caldwell, M.M.; Ballaré, J.F.; Bornman, S.D.; Flint, L.O.; Björn, A.H.; Teramura, G. (2003): Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2: 29-38.
- Capela, M.A.M. A radiação solar. Disponível em <<http://hps.infolink.com.br/uvsolar/#14>>3p.
- Chandel, N.S.; Shumacker, P.T. (2000): Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J. Appl. Physiol.* 88, 1880–1889.
- Chippari-Gomes, A.R.; Gomes, L.C.; Lopes, N.P.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (2005): Metabolic adjustments in two Amazonian Cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 141: 347-355.
- Clements, C.; Ralph, S.; Petras, M. (1997): Genotoxicity of selected herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 29: 277-288.
- Collins, A.; Dusinská, M.; Franklin, M.; Somorovská, M.; Petrovská, H.; Duthie, S.; Fillion, L.; Panayiotidis, M.; Raslová, K.; Vaughan, N. (1997): Comet assay in human biomonitoring studies: Reability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.* 30:139-146.
- Costa, O.T.F.; Pedraça, E.B.; Val, A.L. (1996): Efeito do petróleo sobre o consumo de oxigênio tissular e níveis de eletrólitos plasmáticos de *Colossoma macropomum* (Caraciformes, Serrasalminidae). *Rev. UA Ciên. Biol.* 1: 85-95.
- Cotelle, S.; Ferard, J.F. (2003): Comet assay in genetic ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246-255.
- De Flora, S.; Vigano, L.; D'Agostini, F.; Camoriano, A.; Bagnasco, M.; Bennicelli, C.; Melodia, F.; Arillo, A. (1993): Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutat. Res.* 319: 167-177.
- Diffey, B.L. (1991): Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys. Med. Biol.* 36: 299-328.
- Devaux, A.; Flammarion, P.; Berdard, V.; Garric, J.; Monod, G. (1998): Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and

- cytochrome P4501 a induction chub (*Leuciscus cephalus*). Mar Environ Res. 46: 257-262.
- Emde, G.V.D.; Prechtl, J.C. (1999): Anatomical connections of auditory and lateral line áreas of the dorsal telencephalon (Dm) in the osteoglossomorph teleost, *Gnathonemus petersii*. Brain Research 818: 355-367.
- Esteves, F.A. (1998): Fundamentos de Liminologia. 2 Ed. – Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 602p.
- Farbairn, D.W.; Olive, P.L.; O'Neill, K.L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. Mutation Res. 339: 37-59.
- Farias, I.; Hrbek, T.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J.; Meyer, A. (2003): Avaliação da variabilidade genética das populações de *Arapaima gigas* (pirarucu) da Bacia Amazônica através de marcadores moleculares de microssatélites. In: XV Encontro Brasileiro de Ictiologia. São Paulo.
- Freeman, Z.J. (1995): Amazonian aquatic resources: fishery management and aquaculture development. Manaus/Am. Dissertação de mestrado. INPA/FUA. 121p.
- Fields, J.H.A.; Driedzic, W.R.; French, C.J.; Hochachika, P.W. (1978): Kinetic properties of glutamate dehydrogenase from gills of *Arapaima gigas* and *Osteoglossum bicirrhosum*. Canadian Journal of Zoology Revue Canadienne de Zoologie 56: 809-813.
- Fonseca, T.C.C.; Paquini, R. (2002): Anemia aplástica severa: Análise dos pacientes pediátricos atendidos pelo serviço de transplante de medula óssea do hospital de clínicas de Curitiba no período de 1979-1993. Rev. Assoc. Med. Bras. vol.48 no.3
- Fonseca, G.O.; Campos, R.L.C.; Temporal, W.F. (2005): Efeitos da radiação ultravioleta nas atividades aéreas e terrestres. RMAB 55: 19-26.
- Fontenele, O. (1948): Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu "*Arapaima gigas*" (CUVIER), em cativo (Actinopterygii, Osteoglossidae). Revista Brasileira de Biologia 8: 445-459.
- Frederick, J.E.; Lubin, D. (1994): Solar ultraviolet irradiance at Palmer Station, Antarctica. Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects. Antarctic Research Series 62: 43-52.
- Galdamesportus, M.I.; Noble, R.W.; Farmer, M.; Powers, D.A.; Riggs, A.; Brunori, M.; Fyhn, H.J.; Fyhn, U.E.H. (1979): Studies of the functional properties of the hemoglobins of *Osteoglossum bicirrhosum* e *Arapaima gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology a Physiology 62: 145-154.
- Greenwood, P.H.; Liem, K.F. (1984): Aspiratory respiration in *Arapaima gigas* (Teleostei Osteoglossomorpha): a reappraisal. Journal of Zoology 203: 411-425.
- Grisolia, C.K.; Starling, F.L.R.M. (2001): Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. Mutation Res. 491: 39-44.
- Goulding, M.; Carvalho, M.L.; (1982): Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae) an important Amazonian food fish. Revista Brasileira de Zoologia 107 - 133.
- Goulding, M. (1993): Flooded forests of the Amazon. Scientific American 268: 113 - 120.
- Gudger, E.W. (1943): The giant fresh-water fishes of South America. Sci Monthly 57: 500-513.

- Häder, D.P.; Kumar, H.D.; Smith, R.C.; Worrest, R.C. (1998): Effects on aquatic systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 46B: 53-58.
- Häder, D.P.; Kumar, H.D.; Smith, R.C.; Worrest, R.C. (2003): Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemical and Photobiological Science* 2: 39-50.
- Häder, D.P.; Kumar, H.D.; Smith, R.C.; Worrest, R.C. (2007): Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 267–285.
- Hartmann, A.; Plappert, U.; Raddatz, K.; Grünert-Fuchs, M.; Speit, G. (1994): Does physical activity induce DNA damage. *Mutagenesis* 9: 269-272.
- Hartmann, A.; Speit, G. (1995): Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mut. Res.* 346: 49-56.
- Hayashi, M.; Tice, R.; MacGregor, J.T.; Anderson, D.; Blakey, D.H.; Kirsh-Volders, M.; Oleson, Jr.F.B.; Pachierotti, F.; Romagna, F.; Shimada, H.; Sutou, S.; Vannier, B. (1998): *In vivo* rodent erythrocyte Micronucleus assay. *Mutation Res.* 312: 293-304.
- He, J.L.; Chen, W.L.; Jin, L.F.; Jin, H.Y. (2000): Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutation Res.* 469: 223-231.
- Heddle, J.A. (1973): A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Res.* 18:187 -190.
- Heddle, J.A.; Hite, M.; Kirkhart, B.; Mavournin, K.; Macgregor, J.T.; Newell, G.W.; Salamone, M.F. (1983): The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutation Research* v.123 p.61-118.
- Henriques, J.A.P.; Saffi, J. (2003): Reparação de DNA em Células Eucarióticas In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, editors. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. P 271-303.
- Hollaender, A.; Emmons, C.W. (1941): Wavelength dependence of mutation production in the ultraviolet with special emphasis on Fungi. *C.S.H. Symp. Q. Biol.* 9: 179-186.
- Hollaender, A. (1986): History of radiation biology a personal point of view. In: *Mechanisms of DNA damage and Repair*, Ed M.G. Simic, L. Grossman & A.C. Upon (New York: Plenum).
- Honda, R.T.; Val, A.L.; Demasi, M.; Araujo, R.M.; Horta, B.B. (2005): One-step purification of metallothionein extracted from two different sources. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 820: 205-210.
- Isaacs, R.E.; Kim, H.D.; Bartlett, G.R.; Harkness, D.R. (1977): Inositol pentaphosphate in erythrocytes of a freshwater fish, pirarucu (*Arapaima gigas*). *Life Sciences* 20: 987-990.
- Jantschitsch, C.; Trautinger, F. (2003): Heat shock and UV-B-induced DNA damage and mutagenesis in skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 899–903
- Kammann, U.; Riggers, J.C.; Theobald, N.; Steinhart, H. (2000): Genotoxic potential of marine sediments from the north sea. *Mutation Res.* 467: 161- 168.
- Kaweewat, K.; Hofer, R. (1997): Effect of UV-B radiation on goblet cells in the skin of different fish species. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 41: 222-226.
- Kirchhoff, V.W.J.H. (2003): A radiação ultravioleta. On-line: [http://www.hcanc.org.br/outras\\_infs/ensaios/ozon1.html](http://www.hcanc.org.br/outras_infs/ensaios/ozon1.html).

- Kirsch-Volders, M.; Sofuni, T.; Aardemac, M.; Albertini, S.; Eastmond, D.; Fenech, M.; Ishidate, M.; Kirchner, S.; Lorge, E.; Morita, T.; Norppa, H.; Surralles, J.; Vanhauwaert, A.; Wakata, A. (2003): Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.* 540: 153-163.
- Krishna, G.; Urda, G.; Theiss, J.C. (1994): Comparative mouse micronucleus evaluation in bone marrow and spleen using immunofluorescence and Wright's Giemsa. *Mutation Res.* 323: 11-20.
- Koller, L.R. (1952): Ultraviolet radiation. London: John Wiley & Sons, 270 p.
- Koppen, G.; Verschaeve, L. (1996): The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Res.* 360: 193-200.
- Lebailly, P.; Vigreux, C.; Lechevrel, C.; Ledemeney, D.; Godard, T.; Sichel, F.; LeTalaer, J.Y.; Henry-Amar, M.; Gauduchon, P. (1998): DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: discussion of critical parameters and evaluation of seasonal variations in relation to pesticide exposure. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 7: 917-927.
- Le Curieux, F.; Marzin, D.; Erb, F. (1993): Comparison of three short-term assays: results of seven chemicals, potential contribution to the control of water genotoxicity. *Mutat Res.* 319: 223-236.
- Lee, R.F.; Steinert, S. (2003): Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Res.* 544: 43-64.
- Lemos, C.T.; Rödel, P. M.; Terra, N.R.; Oliveira, N.C. A.; Erdtmann, B. (2007): River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 391-401.
- Maco Garcia, J.T. (1997): Influência da água de formação da extração de petróleo do Rio Urucu sobre aspectos hematológicos e conteúdo iônico de *Colossoma macropomum* e *Glyptoperichthys joselimaianus*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 90p.
- Maia, L.F.P.G.; França, G.B. (2003): Índice Ultravioleta. On-line: <http://www.indiceuv.ufrj.br>, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Matsuo, A.Y.O.; Val, A.L. (2003): Fish Adaptation to Amazonian Black waters. In: *Fish Adaptation* (Kapoor, B.G. & Val, A.L. eds.). Science Publishers Inc, Enfield, NH, USA: 1-36.
- Matsumoto, F.E.; Cólus, I.M.S. (2000): Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet Mol Biol* 23: 489-492.
- Matsuo, A.Y.O.; Wood, C.M.; Val, A.L. (2005): Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology* 74: 351-364.
- Mavournin, K.H.; Blakey, D.H.; Cimino, M.C.; Salamone, M.F.; Heddle, J.A. (1990): The *in vivo* Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 239: 29-80.

- McKelvey-Martin, V.J.; Green, M.H.L.; Schmezer, P.; Pool-Zobel, B.L.; De Méo, M.P.; Collins, A. (1993): The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. *Mutation Res.* 288: 47-63.
- Menezes, R.S. (1951): Notas biológicas e econômicas sobre o pirarucu. Série estudos técnicos nº 3. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura.
- Meunier, F.J. (1984): Structure and mineralization of the scales in some Osteoglossidae (Osteichthyes, Teleost). *Annales Des Sciences Naturalles Zoologie et Biologia Animale* 6: 111-124.
- Minissi, S.; Ciccotti, E.; Rizzoni, M. (1996): Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research* 367: 245- 251.
- Mitchell, D. L.; Meador, J. A.; Byrom, M.; Walter, R.B. (2004): Resolution of UV-Induced DNA Damage in Xiphophorus Fishes. *Marine Biotechnology* 3: 1436-2236.
- Mitchellmore, C.L.; Chipman, J.K. (1998): Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquatic Toxicology* 41: 161-182.
- Miyamae, Y.; Yamamoto, M.; Sasaki, Y.F.; Kobayashi, H.; Igarashi-Soga, M.; Shimoi, K.; Hayashi, M. (1998): Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation Res.* 418: 131-140.
- Moura, M.A.F.; Farias, I.P.; Val, A.L. (1994): Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27: 1589-1598.
- Mouret, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. (2006): Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *PNAS* 103, 13765–13770.
- Nacci, D.E.; Cayula, S.; Jackim, E. (1996): Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology* 35: 197-210.
- Nascimento, T.L.A.S.; Oliveira, C.P.F.; Oliveira, S.S.; Brandão, V.M.; Araújo, R.M.; Ramos, M. F. S; Paula-Silva, M.N.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Chippari-Gomes, A.R. (2005): Estudo de biomarcadores em duas espécies de peixes da Amazônia Central expostas ao petróleo. In: I Congresso Internacional do PIATAM, 102.
- Nascinbeni, B.; Phillips, M.D.; Croom, D.K.; Andrews, P.W.; Tice, R.R.; Nauman, C.H. (1991): Evaluation of DNA damage in golden mice (*Ochrotomys nuttalli*) inhabiting a hazardous waste site. *Environ. Mol. Mutagen.* 17: 55.
- Oliveira, A.M.; Val, A.L.; Chagas, E.C.; Roubach, R. (2001): Efeito da temperatura sobre os parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* alimentado com vitamina C. *Relatório PIBIC*. INPA/FUA. Manaus-Am.
- Oliveira, C.P.F. (2003): Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am, sobre o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, do convênio INPA/UFAM. Manaus, Amazonas, 70p.



- Oliveira, S.S.; Brandão, V.M.; Chippari-Gomes, A.R.; Paula-Silva, M.N.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (2005): Estudo da enzima Glutathione-S-Transferase como biomarcador no monitoramento do trecho Coari-Manaus em três espécies de peixes. In: 1º Congresso Internacional PIATAM, Manaus. Integridade Biótica na Amazônia.
- Pandrangi, R.; Petras, M.; Ralph, S.; Vrzoc, M. (1995): Alkaline Single Cell Gell (Comet) assay and Genotoxicity Monitoring Using Bullheads and Carp. *Environ Mol Mutagen* 26: 345-356.
- Parisi, A.V.; Wong, J.C.F. (2000): An estimation of biological hazards due to solar radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 54: 126-130.
- Pinhatti, V.R.; Allgayer, M.; Breyer, A.S.; Pereira, R. A.; Silva, J. (2006): Determinação de danos basais no DNA de Araras Canindé (*Ara ararauna*) através do teste de micronúcleos: uma ferramenta na avaliação da saúde animal e seu uso no biomonitoramento da poluição ambiental. *Acta Scientiae Veterinariae* 34: 313-317.
- Pinese, J.F. (1996): Morfologia funcional da alimentação do pirarucu (*Arapaima gigas*). Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade de São Carlos, São Carlos.
- Penneys, N.S.; Laguette, J. (1998): Cutaneous Reactions to exogenous agents. In: Barnhill, R.L. (Eds.), *Textbook of dermatopathology*. New York: McGrawHill, p. 271-278.
- Rajaguru, P.; Suba, S.; Palanivel, M.; Kalaiselvi, K. (2003): Genotoxicity of a polluted River System measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ. Mol. Mutagen.* 41:85-91.
- Ralph, S.; Petras, M.; Pandrangi, R.; Vrzoc, M. (1997): Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ. Mol. Mutagen.* 28: 112-120.
- Rapp, A.; Greulich, K.O. (2004): After double - strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *Journal of Cell Science* 117: 4935-4945.
- Reichrath, J. (2006): The challenge resulting from positive and negative effects of sunlight: How much solar UV exposure is appropriate to balance between risks of vitamin D deficiency and skin cancer? *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92: 9-16.
- Rodriguez-Cea, A.; Ayllon, F.; Garcia-Vazquez, E. (2003): Micronucleus test in freshwater fish species: na evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 442-448.
- Rozema, J.; Björn, L.; Bornman, J.; Gaberscik, A.; Häder, D.; Trost, T.; Germ, M.; Klish, M.; Gröniger, A.; Sinha, R.; Lebert, M.; Buffoni-Hall, R.; De Bakker, N.; Staij, J.; Meijkamp, B. (2002): The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystem - an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 66B: 2-12.
- Russo, C.; Rocco, L.; Morescalchi, M.A.; Stingo, V. (2004): Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57: 168-174.
- Saidel, W.M.; Bradford, M.R.Jr. (1987): Fundal variations in the eyes of the Osteoglossomorph fishes. *Brain Behavior and Evolution* 27: 80-92.

- Saint-Paul, U. (1984): Ecological and physiological investigations on *Colossoma macropomum*, a new species for fish culture in Amazonia. Mem. Assoc. Latinoam. Acuicult. 5: 501-518.
- Saint-Paul, U. (1988): Diurnal routine O<sub>2</sub> consumption at different O<sub>2</sub> concentrations by *Colossoma macropomum* and *Colossoma brachypomum* (teleostei: Serrasalminidae). Com. Biochem. Physiol. 89: 675-682.
- Salagovic, J.; Gilles, J.; Veschaeve, L.; Kalina, I. (1996): The Comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: A promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. Folia Biologica (Praha) 42:17-21.
- Salamone, M.F.; Heddle, J.A. (1983): The Bone Marrow Micronucleus Assay: Rationale for a Revised Protocol. Chemical Mutagen. 8: 111-149.
- Santos, A.L.Q.; Moura, C.R. (2002): Estudo anatômico do crânio de *Arapaima gigas* (CUVIER) (*Actinopterygii*, *Osteoglossidae*). Revista Horizonte Científico 1: 2-16.
- Salo, H.; Jokinen, E.; Markkula, S.; Aaltonen, T.; Penttilä, H. (2000): Comparative effects of UVA and UVB irradiation on the immune system of fish. Journal of Photochemistry and Photobiology 56B: 154-162.
- Sampaio, F.G.; Boijink, C.L.; Oba, E.T.; Santos, L.R.B.; Kalinin, A.N.; Tadeu, F. (2008): Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. Comparative Biochemistry and Physiology 147: 43-51.
- Sasaki, Y.F.; Izumiyama, F.; Nishidate, E.; Ishibashi, S.; Tsuda, S.; Matsusaka, N.; Asano, N.; Saotome, K.; Sofuni, T.; Hayashi, M. (1997): Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. Mutation Res. 393: 133-139.
- Satoh, M.S.; Lindahl, T. (2004): Enzymatic repair of oxidative DNA damage. Cancer Res. 54: 1899-1901.
- Sastre, M.P.; Vernet, M.; Steinert, S. (2001): Single-cell gel/comet assay applied to the analysis of UV radiation-induced DNA damage in *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta), Photochem. Photobiol. 74: 55-60.
- Shinohara, A.; Ogawa, T. (1995): Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. Trends Biochem. Sci. 20: 387-391.
- Sinha, R.P.; Häder, D.P. (2002): UV-induced DNA damage and repair: a review. Photochem. Photobiol. Sci. 1: 225-236.
- Schaberle, F.A.; Silva, N.C. (2000): Introdução à Física da Radioterapia. Santa Catarina. Disponível em <http://www.fsc.ufsc.br/~canzian/introt/efeitos.html>. Acesso em 31/08/2006.
- Schmid, W. (1975): The micronuclei test. Mutation Res. 31:9-15.
- Schmitz-Hoerner, R.; Weissenböck, G. (2003): Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UVB levels. Phytochemistry 64:243-255.
- Schwartz, T. (1998): UV light affects cell membrane and cytoplasmic targets. Journal of Photochemistry and Photobiology 44: 91-96.
- Setlow, R.B. (1961): The action spectrum for the reversal of the dimerization of thymine induced by ultraviolet light. Biochim. Biophys. Acta 49:237-238.

- Setlow, R.B.; Setlow, J.K. (1962): Evidence that ultraviolet-induced thymine dimmers in DNA cause biological damage. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 48: 1250-1257.
- Setlow, R.B.; Carrier, W.L. (1963): Identification of ultraviolet induced thymine dimmers in DNA by absorbance measurements. *Photochem. Photobiol.*, 2: 49-57.
- Setlow, R.B.; Carrier, W.L. (1964): The disappearance of thymine dimmers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 52: 226-231.
- Silva, J.; Freitas, T.R.O.; Heuser, V.; Marinho, J.R.; Erdtmann, B. (2000): Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environ Mol Mutagen* 35: 270-278.
- Silva, J.; Heuser, V.; Andrade, V.M. (2003a): Biomonitoramento Ambiental. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, editors. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. p 165-180.
- Silva, J.A.M.; Pereira-Filho, M.; Oliveira-Pereira, M.I. (2003b): Valor energético de espécies vegetais importantes na alimentação do tambaqui. *Acta Amazonica* 33: 687-700.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Somogyi, Z. (2000): Radiation response of cell organelles. *Micron*. 31: 165-181.
- Speit, G.; Hartmann, A. (1996): Nachweis von Genotoxischen Umweltschadstoffen mit dem "Comet Assay". In: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (Projekt, Angewandte Ökologie). Ulm, 114 pp.
- Teixeira, A.S. & Jamieson, A. (1985): Genetic variation in plasma transferrins of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Amazoniana*, IX (2): 159-168.
- Tice, R.R. (1995): Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotóxico pollutants. In: Butterworth BE, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, editors. *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of Environmental Change*. New York: Plenum Press. p. 69-79.
- Tice, R.R. ; Ormiston, B.G. ; Boucher, R. ; Luke, C.A. ; Paquette, D.S. (1998) : Environmental biomonitoring with feral rodent species. In *Application of Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures*, sandhu S, Waters MD, editors. Plenum Publishing Co., New York, p.175-180.
- Tiegte, J.E.; Diamond, S.A.; Ankley, G.T.; DeFoe, D.L.; Holcombe, G.W.; Jensen, K.M.; Degitz, S.J.; Elonen, G.E.; Hammer, E. (2001): Ambient solar UV radiation causes mortality in larvae of three species of rana under controlled exposure conditions. *Photochem. Photobiol.* 74: (2).
- Todo, T. (1999): Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat. Research*, 434: 89-97.
- Thomas, P.; Umegaki, K.; Fenech, M. (2003): Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis* 18:187-194.
- Unna, P.G. (1894): *Histopathologie der Hautkrankheiten*. August Hirschwald, Berlin.
- Upton, A.C. (2000): Radiation Injury. In: L, G., Bennett, J.C. (Eds.), *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia: Saunders, p. 62-68.

- Val, A.L.; Affonso, E.G.; Souza, R.H.D.S.; Almeida-Val, V.M.F.; Moura, M.A.F.D. (1992): Inositol pentaphosphate in the erythrocytes of amazonian fish, the pirarucu (*Arapaima gigas*). Canadian Journal of Zoology 70:852-855.
- Val, A.L. (1995): Oxygen transfer in fishes: Morphological and molecular adjustments. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 28: 1119-1127.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (1995): Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and Biochemical Features. Heidelberg, Springer Verlag.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (1999): Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. In: Val, A.L. & Almeida-Val, V.M. (Eds). Biology of tropical fishes. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. p. 277-291.
- Val, A.L.; Castro-Pérez, C.A.; Almeida-Val, V.M.F. (2004): UV: an environmental challenge for fish of the Amazon. In: VI International Congress on Biology of Fishes, 2004, Manaus. Advances in Fish Biology. Vancouver: American Fisheries Society - Physiology Section 1, 1-5.
- Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S. (2007): Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 04: 004.
- Verschaeve, L.; Gilles, J. (1995): Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. Bull. Environ. Contamination Toxicol. 54: 112-119.
- Vetter, R.D.; Kurtzman, A.; Mori, T. (1999): Diel cycles of DNA damage and repair in eggs and larvae of northern archovy, *Engraulis mordax*, exposed to ultraviolet radiation. 14: 1-9.
- Villela, I.V.; Lau, A.; Silveira, J.; Pra, D.; Rolla, H.C.; Silveira, J.D. (2003): Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. Genética Toxicológica. p.147-161.
- Villela, I. V.; Oliveira I.; Silva, J.; Henriques, J.A.P. (2006): DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. Mutation Research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis 605: 78-86,
- Villela, I. V.; Oliveira I.; Silveira, J.C.; Dias, J.; Henriques, J.A.P.; Silva, J. (2007): Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 628: 76-86
- Webb, A.R.; Holick, M.F. (1988): The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. Annual Review Nutrition 8: 375-99.
- West, J.L.; Bailey, J.R.; Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Sidell, B.D.; Driedzic, W.R. (1999): Activity levels of enzymes of energy metabolism in heart and red muscle are higher in north-temperate-zone than in Amazonian teleosts. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie 77: 690-696.
- Wiegand, M.D.; Young, D.L.W.; Gajda, B.M.; Thuen, D.J. M.; Rittberg, D.A.H.; Huebner and, J.D.; Loadman, N.L. (2004): Ultraviolet light-induced impairment of goldfish embryo

- development and evidence for photorepair mechanisms. *Journal of Fish Biology* 64: 1242-1256.
- Wild, D. (1978): Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by micronucleus test. *Mutation Res.* 56: 319-327.
- Williams, J.W., Jackson, S.T., Kutzbach, J.E. (2007): Projected distributions of novel and disappearing climates by 2100. *PNAS* 104: 5738-5742.
- Williamson, C.E.; Metzgar, S.L.; Lovera, P.A.; Moeller, R.E. (1997): Solar ultraviolet radiation and the spawning habitat of yellow perch, *Perca flavescens*. *Ecol. Appl.* 7:1017-1023.
- Winckler, K.; Fidhiany, L. (1996): Significance influence of UVA on the general metabolism in the growing Cichlid fish, *Cichlasoma nigrofasciatum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 33: 131-135.
- Winter, M. J.; Ellis, L. C.J.; Hutchinson, T.H. (2007): Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. *Mutation Research* 629: 89-99.
- Wojcik, A.; Bochenek, A.; Lankoff, A.; Lisowska, H.; Padjas, A.; Irena, S.; Sonntag C.; Obe, G. (2006): DNA interstrand crosslinks are induced in cells prelabelled with 5-bromo-20-deoxyuridine and exposed to UVC radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 84:15-20.
- Wood, C.M.; Wilson, R.W.; Gonzalez, R.J.; Patrick, M.L.; Bergman, H.L.; Narahara, A.; Val, A.L. (1998): Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*) to low pH and extremely soft water. *Physiological Zoology* 71: 658-670.