

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE AMOSTRAS
AMBIENTAIS DA REGIÃO HIDROGRÁFICA DA BACIA DO LAGO GUAÍBA**

Izabel Vianna Villela

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

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Co orientadora: Profa. Dra. Juliana da Silva

Porto Alegre (RS)

Junho de 2006

Os testes de mutagenicidade foram desenvolvidos no GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade, do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A determinação de químicos inorgânicos foi realizada no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A coleta de *Limnoperna fortunei* foi realizada dentro do Parque Estadual de Itapuã, com a autorização do Departamento de Unidades de Conservação da Secretaria Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. Esta pesquisa foi financiada pela Companhia Petroquímica do Sul - COPESUL e pelo GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade, contando ainda com o apoio da CAPES, CNPq e FAPERGS.

“Vou vivendo o que o rio faz

Quando o rio não faz nada

Vejo os rastros que ele traz

Numa seqüencia arrastada

Do que ficou para trás”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

São muitas as pessoas a quem prestar homenagem neste momento, amigos, colegas, parceiros e colaboradores que foram fundamentais na execução deste trabalho. À todos, Muito Obrigada. No entanto não posso deixar de agradecer a algumas destas especialmente:

Ao meu orientador Henrques, pelo apoio, compreensão, amizade e pelas inúmeras oportunidades geradas durante este percurso.

À minha co-orientadora Juliana, pela atenção, compreensão e amizade despendidas em longas discussões durante a execução e escrita deste trabalho.

À Profa. Dra. Vera Vargas pela cuidadosa revisão deste manuscrito que resultou em significativas melhorias para o texto.

À Banca examinadora, Profa Dra. Berenice Jordão, Profa. Dra. Vera Vargas, Prof. Dr. Atrhur Fett e Profa. Dra. Célia Carlini, pela disposição em avaliar este trabalho.

Ao Departamento de Unidades de Conservação da Secretaria Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, pela liberação de entrada para coleta no Parque Estadual de Itapuã.

À Companhia Petroquímica do Sul (COPESUL) pelo auxílio na execução das coletas de água e sedimento, especialmente Carla Rangel, Sepé Tiaraju dos Santos e a equipe técnica da Unidade de Segurança, Saúde e Meio Ambiente e, em especial ao Neves, pelas inúmeras coletas que realizamos juntos.

Ao seu Salomão (pescador da Colônia Z5) e sua família pela exaustiva coleta e inúmeras informações compartilhadas.

À Profa Dra. Cristina Mansur, pela disposição em sempre prestar informações sobre o mexilhão dourado.

Ao Leonardo Pelegrini da ECOPLAN e por seu intermédio ao Rogério Dewes do Departamento de Recursos Hídricos da Secretaria Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, pelas informações a respeito da Bacia Hidrográfica do Guaíba.

Aos professores do PPGBCM, pelo aprendizado durante este longo percurso.

À Silvia Centeno, ao Lúciano Fernandes e à Graziela Ramos pelos inúmeros auxílios e pela amizade ao longos destes anos.

Aos Profs Dr. Giancarlo Pasquali e Bernardo Erdtmann, pelos comentários durante as reuniões de acompanhamento.

Ao Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias, pelo auxílio técnico e detecção de elementos inorgânicos por PIXE no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da UFRGS.

Ao Prof. Dr Thales de Freitas por dispor das instalações do seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de Citogenética, Daniel, Vanina e Vanessa pelo valioso auxílio na fase inicial deste projeto e pela amizade que iniciou neste período.

Aos meus bolsistas e amigos Iuri, meu “braço direito” e Juliano, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Aos colegas dos laboratórios 210, 212 da Biofísica e laboratório 219 do Biotecnologia, que foram muitos ao longos desses anos mas que sempre contribuiriam com sugestões, auxílios ou descontraindo o ambiente, estas amizades são muito importantes.

Aos meu amigos Genotóxicos do coração Miriam, Jaque, Gabriel, Rose, Márcia, Miriana, Camila, Ana Amélia, Silvia, Rafael, entre tantos outros que passaram pelo laboratório com quem aprendi muito durante estes sete anos.

A minha amiga Miriam pelo incentivo constante, amizade inabalável e inúmeras correções do texto.

A todos os meus grandes amigos, que mesmo sem saber foram fundamentais em todos os momentos da minha vida, entre eles especialmente à Carolina, Kelen, Débora, Iara, Rita, Inessa, Cibelem, Lorena, Gabriela, Patricia, Patricia e amigos do movimento da 4^a.

A toda a minha família, tios, primos, sogros, cunhados, que são a base da minha vida.

Aos meus irmãos e cunhados Cláudio, Ana Laura, Adriana e Alessandro, e as “agregadas” Carolina e Rita pela vida de experiências, carinho e apoio compartilhados.

Aos meus sobrinhos Kael, Sofia e Gabriel, que vieram iluminar nossas vidas.

À minha Vó Maria (*em memória*), que auxiliou na minha criação ajudando a formar a pessoa que sou hoje.

Ao meu Pai Wellington (*em memória*), que sempre me incentivou e acreditou que, com o meu esforço e estudo, eu poderia conseguir tudo na vida, sempre me fazendo sentir que tinha um porto seguro voltar.

À minha mãe Maria Laura, que me possibilitou tudo na vida, me ensinou a ser forte e responsável, me mostrando que a vida sempre continua o seu caminho.

Ao Roger, meu companheiro nesta jornada e na vida, que com seu amor sempre me ajudou a manter o rumo certo.

Sumário

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	13
Abstract.....	15
Apresentação.....	17
I Introdução.....	19
1 Região Hidrográfica do Lago Guaíba.....	19
1.1 Sub-bacias da região Hidrográfica do Guaíba.....	21
2 Contaminação dos Corpos Hídricos.....	25
2.1 Poluição das Águas.....	26
2.2 Poluição na Região Hidrográfica do Guaíba.....	28
3 Avaliação da Genotoxicidade.....	31
4 Biomarcadores deste estudo.....	35
4.1 Teste de <i>Salmonella</i> /microssoma.....	35
4.2 Ensaio Cometa.....	39
4.3 Teste de Micronúcleos.....	42
5 Biomonitor deste Estudo: <i>Limnoperna fortunei</i> (Dunker, 1857).....	43
II Objetivos.....	48
III Capítulo 1 - DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (<i>Limnoperna fortunei</i>) Exposed to Environmental Contaminants.....	50
IV Capítulo 2 - Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on <i>Limnoperna fortunei</i> exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions.....	73
V Capítulo 3 - Study on Environmental Quality Evaluation in a Region Under the	

Influence of Urban waste in the Guaíba lake basin (Brazil).....	98
VI Discussão.....	124
1 Padronização de um organismo para biomonitorar a Região Hidrográfica do Lago Guaíba.....	124
2 Contribuição dos rios: importância da contaminação por efluente urbano..	126
3 Exposição <i>in situ</i> X exposição em laboratório.....	130
4 Avaliação de risco: como usar os resultados de organismos sentinelas.....	132
VII Conclusões.....	134
VIII Perspectivas.....	136
Bibliografia.....	138
Anexo - Curriculum vitae	147

Lista de Figuras

I Introdução.....	19
Figura 1: Região Hidrográfica do Lago Guaíba e suas sub-bacias.....	20
Figura 2: Esquema do funcionamento do sistema regulatório SOS.....	36
Figura 3: Esquema mostrando ativação metabólica de compostos policíclicos apolares pelo sistema do citocromo P – 450 em uma célula típica de mamífero, formando intermediários reativos que se ligam aos centros nucleofílicos do DNA	39
Figura 4: Ensaio cometa. Células da hemolinfa do mexilhão <i>Limnoperna fortunei</i> exposto a sulfato de cobre, coradas com nitrato de prata, mostrando as diferentes classes de dano.....	42
Figura 5: Micronúcleo em célula da hemolinfa do mexilhão <i>Limnoperna fortunei</i> exposto a sulfato de cobre.....	43
Figura 6: Mexilhão dourado (<i>Limnoperna fortunei</i>)	45
III Capítulo 1 - DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (<i>Limnoperna fortunei</i>) Exposed to Environmental Contaminants.....	50
Fig. 1: a) Different classes of cell damage as detected by the comet assay in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> ; b) Haemolymph cell of <i>Limnoperna fortunei</i> showing a micronucleus.....	59
Fig. 2: Detection of DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> exposed <i>in vitro</i> to UVC for different periods.....	62
Fig. 3: Repair of DNA damage in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> exposed <i>in vivo</i> to Pentachlorophenol.....	64
IV Capítulo 2 - Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on <i>Limnoperna fortunei</i> exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions.....	73
Figure 1: Map showing the Guaíba hydrographic region in Rio Grande do Sul State (Brazil) and the sampling sites.....	79
Figure 2: Climate data of the studied region during the sampling periods.....	84

Figure 3: Inorganic elements detection by PIXE analyzes in the entire body of <i>Limnoperna fortunei</i> individuals exposed to environmental samples from Guaíba basin.....	87
Figure 4: Historical physical-chemical data of a) Biochemical Oxygen Demand (BOD) and b) Coliform are presented as annual average.....	91
V Capítulo 3 - Study on Environmental Quality Evaluation in a Region Under the Influence of Urban waste in the Guaíba lake basin (Brazil).....	98
Figure 1: Map showing the Guaíba river basin region in Rio Grande do Sul State (Brazil) and the sampling sites.....	103
Figure 2: Inorganic elements of surface water samples from the Guaíba river basin by PIXE.....	113
Figure 3: Inorganic elements in the body of <i>L. fortunei</i> individuals exposed <i>in situ</i> and in laboratory to environmental samples from the Guaíba river basin sampled in the Summer by PIXE.....	114

Lista de Tabelas

I Introdução.....	19
Tabela 1: Classificação do Lago Guaíba e seus principais afluentes.....	29
Tabela 2: Relação do pH da eletroforese do ensaio cometa com o tipo de dano no DNA que pode ser detectado.....	41
III Capítulo 1 - DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (<i>Limnoperna fortunei</i>) Exposed to Environmental Contaminants.....	50
Table 1: Detection of DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> at different periods after mussel sampling.....	61
Table 2: Detection of basal DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> using different pH values during electrophoresis..	61
Table 3: Detection of DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> exposed <i>in vivo</i> to copper sulphate (CuSO ₄) and pentachlorophenol (PCP) at different doses.....	63
Table 4: Detection of micronucleus frequency in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> exposed <i>in vivo</i> to copper sulphate (CuSO ₄) and pentachlorophenol (PCP) at different doses and different exposure times.....	64
Table 5: DNA damage by the comet assay and micronuclei frequency in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> compared with <i>Girardia schubarti</i> exposed <i>in vivo</i> to environmental sample.....	65
IV Capítulo 2 - Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on <i>Limnoperna fortunei</i> exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions.....	73
Table 1: Main contamination sources in the sampling sites.....	79
Table 2: Detection of DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> individuals exposed to environmental samples from Guaíba basin.....	85
Table 3: Detection of micronuclei frequency in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> individuals exposed to environmental samples from Guaíba basin.....	85
Table 4: Data from physical-chemical analysis carried out <i>in situ</i> during sampling.....	88

V Capítulo 3 - Study on Environmental Quality Evaluation in a Region Under the Influence of Urban waste in the Guaíba lake basin (Brazil).....	98
Table 1: Mutagenic evaluation of surface water samples from the Guaíba river basin by <i>Salmonella</i> /microsome assay in TA 98 and TA100 strains, with and without metabolic activation.....	109
Table 2: Mutagenic evaluation of interstitial water samples from the Guaíba basin by <i>Salmonella</i> /microssoma assay in TA 97a, TA 98, TA100 and TA102 strains, with and without metabolic activation.....	110
Table 3: Detection of DNA damage by the comet assay and micronuclei frequency in haemolymph cells of <i>Limnoperna fortunei</i> individuals exposed <i>in situ</i> and in laboratory to environmental samples from the Guaíba river basin	112
Table 4: Historical physical-chemical mean values from the Guaíba lake.....	118

Resumo

O uso de bioensaios genéticos é uma importante ferramenta na avaliação da contaminação ambiental. Esta poluição, que em grande parte tem origem nas atividades humanas, é liberada no ambiente tendo como destino final, preferencialmente, os corpos d'água. No Rio Grande do Sul, a maior parcela da população e da produção interna do estado estão localizados na Região Hidrográfica do Lago Guaíba, sendo este, por consequência, um grande receptor de contaminantes urbanos, industriais e rurais. Neste contexto, o bivalve exótico *Limnoperna fortunei* (mexilhão dourado) foi escolhido, com base em dados de sua população e distribuição, como possível organismo biomonitor nesta região. Neste estudo, foram padronizadas as metodologias do ensaio cometa e teste de micronúcleos para hemócitos de *L. fortunei*. A sensibilidade dos mexilhões *in vitro*, foi avaliada pela exposição das células à radiação ultravioleta e *in vivo* pela exposição dos organismos aos agentes químicos com potencial genotóxico sulfato de cobre e pentaclorofenol. A radiação ultravioleta induziu uma relação dose resposta, com dano máximo, detectado pelo ensaio cometa, na dose de 4.2 J/m². Para as avaliações *in vivo*, os organismos foram expostos aos agentes químicos por duas horas para o ensaio cometa e 24 e 48 horas para o teste de micronúcleos. Ambos compostos induziram danos gerando uma curva dose-resposta. O sulfato de cobre induziu a maior genotoxicidade na dose de 20 µg/ml, apresentando toxicidade em 48 horas de exposição. Para pentaclorofenol, o máximo de dano foi observado na exposição de 150 µg/L em ambos os ensaios. Animais expostos a pentaclorofenol apresentaram 100% de reparação do DNA 2 horas após a exposição. Em exposição dos mexilhões por sete dias a amostras ambientais contaminadas por compostos genotóxicos, também foi possível a detecção de danos por ambos os ensaios.

Após a padronização das metodologias e verificação da sensibilidade, o mexilhão dourado foi utilizado para avaliar o potencial genotóxico de amostras de água superficial e sedimento da Bacia do Guaíba. As amostras de água e sedimento foram coletadas em oito pontos da Região Hidrográfica do Lago Guaíba, cinco na região de foz dos principais rios formadores do lago Guaíba (Gravataí, Sinos, Caí, Jacuí e Taquarí), um na foz do arroio Dilúvio, que corta a cidade de Porto Alegre, e em dois pontos dentro do lago Guaíba (Guaíba PC e Guaíba BR), próximo a locais de liberação de esgoto urbano

(Guaíba BR e Guaíba PC). Foram avaliadas as estações do ano inverno e primavera e verão. Os moluscos foram coletados no Parque Estadual de Itapuã e aclimatados por no mínimo 7 dias em laboratório. Os organismos foram expostos por 7 dias as diferentes amostras ambientais, sendo trocado $\frac{1}{4}$ do volume de água e sedimento a cada 24h. Foi evidenciada indução de dano ao DNA pelas amostras do rio Jacuí, possivelmente relacionado com atividades de extração de carvão nesta região. As amostras do rio Taquari também induziram genotoxicidade, provavelmente como consequência da intensa liberação de efluentes da indústria alimentícia na região. Foi possível observar uma fraca relação entre a presença de elementos inorgânicos, detectada pelo método de PIXE (Próton Induced X Ray Emission), no corpo mole dos moluscos e a indução de danos ao DNA. No entanto, mais de 60% dos resultados positivos encontrados em ambos os ensaios, foram relacionados a locais com ampla liberação de esgoto (rio Gravataí, do arroio Dilúvio e os dois locais de coleta no lago Guaíba).

Entendendo que a contaminação de origem urbana parece ser o maior problema dentro desta Região Hidrográfica, dois dos locais de coleta que sofrem com esta influência, Guaíba BR e Guaíba PC, foram mais detalhadamente avaliados em duas estações do ano, inverno e verão. Amostras de água superficial e de lixiviado de sedimento foram testadas por método direto quanto à indução de mutagênese pelo ensaio *Salmonella*/microsoma. Exemplares de *L. fortunei*, também foram avaliados em dois tipos de exposição: *in situ*, onde exemplares coletados diretamente nos locais avaliados foram avaliados sem tratamento no laboratório e exposição em laboratório, onde os animais foram coletados em Itapuã e expostos as amostras em laboratório. Apenas uma amostra de água superficial, Guaíba BR no inverno, apresentou mutagenicidade na linhagem TA98 em presença de ativação metabólica. Esta mesma amostra induziu danos ao DNA, detectados pelo ensaio cometa, em hemócitos de moluscos expostos em laboratório e coletados *in situ* e também aumentou a freqüência de micronúcleos em animais expostos *in situ*. As amostras do ponto Guaíba PC induziram aumento significativo de micronúcleos em moluscos expostos tanto em laboratório quanto *in situ*. A influência de elementos inorgânicos, detectados pelo método de PIXE nas amostras de água e no corpo mole dos moluscos, parece ser menos importante do que a contaminação por compostos orgânicos. Estes resultados salientam a forte influência de contaminantes orgânicos nesta região, destacando o biomonitoramento com o mexilhão dourado como uma importante ferramenta no diagnóstico deste tipo de contaminação.

Abstract

The use of genetic bioassays is an important tool in environmental contamination assessment. This pollution, which for the most part has its origin in human activities, is discharged to the environment and will usually have water bodies as its final destination. In Rio Grande do Sul state, the largest population and most of the state internal production are concentrated on the Guaíba Lake River Basin which becomes, as a consequence, a significant recipient of urban, industrial and rural contaminants. In this context, the introduced species *Limnoperna fortunei* (golden mussel) was chosen based on data on its population and distribution as a potential biomonitoring organism for this region. In the present study, the comet test and micronuclei test methodologies for *L. fortunei* hematocytes were standardized. The *in vitro* sensitivity of mussels was assessed by exposing cells to ultraviolet radiation and their *in vivo* sensitivity was assessed by exposing the organism to chemicals with genotoxic potential, copper sulfate and pentachlorophenol. Ultraviolet radiation induced a dose-response relationship, with maximum damage, as detected by the comet test, at a dose of 4.2 J/m². For the *in vivo* assessment, organisms were exposed to the chemicals for two hours for the comet test and 24 and 48 hours for the micronuclei test. Both compounds induced damage, generating a dose-response curve. Copper sulfate induced the greatest genotoxicity in the dose of 20 µg/ml, showing toxicity after 48 hours exposure. For pentachlorophenol, maximum damage was found at the exposure to 150 µg/L in both tests. Animals exposed to pentachlorophenol showed 100% DNA repair 2 hours after exposure. In exposure of the mussels for seven days to environmental samples contaminated by genotoxic compounds, damage could also be detected using both tests.

After standardizing the methods and checking for sensitivity, the golden mussel was used to assess the genotoxic potential of surface water and sediment of the Guaíba Lake Basin. Water and sediment samples were collected at eight sites of the Guaíba Lake Basin, five at the area of the mouth of the main rivers that form the Guaíba lake (Gravataí, Sinos, Caí, Jacuí and Taquarí), one at mouth of the Dilúvio brook that crosses the city of Porto Alegre and at two sites at the Guaíba lake (Guaíba PC and Guaíba BR), close to urban sewage discharges (Guaíba BR and Guaíba PC). An assessment was made in winter, spring and summer. The mollusks were collected at Itapuã State Park and acclimatized for at least 7 days in the laboratory. Organisms were exposed for 7 days to

the different environmental samples with $\frac{1}{4}$ of the water and sediment changed every 24 hours. DNA damage was shown to be caused by the Jacuí river samples, possibly related to coal mining in the area. The Taquari river samples also induced genotoxicity, probably as a consequence of intense discharge of food industry waster water in the region. A weak relationship could be seen between the presence of inorganic elements detected by the PIXE method (Proton Induced X-Ray Emission) in the soft body of the mollusks and DNA damage. However, over 60% of the positive results found in both tests were related to the sites with extensive sewage discharge (Gravataí river, Dilúvio brook and the two collection sites at Guaíba lake).

Knowing that urban contamination seems to be the most severe problem in this River Basin, two of the collection sites that are under the impact of this contamination, Guaíba BR and Guaíba PC were assessed in more depth in two different seasons, winter and summer. Surface water and sediment leachate samples were tested by the direct method regarding the induction of mutagenesis using the *Salmonella*/microsome test. *L. fortunei* individuals were also tested in two types of exposure: *in situ* exposure, where animals collected directly at the assessed sites were assessed without laboratory treatment, and laboratory exposure, where animals were collected at Itapuã State Park and exposed to samples in the laboratory. Only one surface water sample, Guaíba BR in winter, showed mutagenicity in line TA98 in the presence of metabolic activation. This same sample induced DNA damage, detected by the comet test, in hemocytes of the mollusks exposed in laboratory and collected *in situ* and also increased micronuclei frequency in animals exposed *in situ*. Samples from the Guaíba PC site induced a significant increase in micronuclei in mollusks exposed both in the laboratory and *in situ*. The influence of inorganic elements detected by the PIXE method in the water samples and in the soft body of the mollusks seems to be less important than the contamination by organic compounds. These results also stress the strong influence of organic contaminants, showing that biomonitoring with the golden mussel is an important tool in the diagnosis of this type of contamination.

Apresentação

Conheci a mutagênese ambiental ainda durante a graduação na Universidade Federal de Pelotas. Durante o último ano da faculdade, busquei possibilidades de mestrado, sendo neste caminho apresentada ao prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques. Depois de uma conversa, e alguma insistência da minha parte, ele me propôs realizar o mestrado no Programa de Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul avaliando amostras de água superficial da região de foz dos rios formadores da Bacia do Lago Guaíba e alguns pontos dentro do Lago Guaíba. Durante este projeto, foi possível observar uma maior contaminação genotóxica por efluentes urbanos. No entanto, ficou claro que ainda havia muito a ser compreendido nesta região. Por este motivo, propusemos para o projeto de doutorado, em conjunto com a profa. Dra. Juliana da Silva, um biomonitoramento na Região Hidrográfica do Guaíba. Para tanto, foi necessário selecionar um organismo biomonitor. Neste momento, o mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) já estava introduzido e adaptado à região, no entanto com uma distribuição ainda restrita. Contudo, este bivalve apresentou todas as características que estávamos procurando, se colocando com uma forte opção de organismo biomonitor. O primeiro capítulo desta tese, publicado no periódico Mutation Research, descreve o processo de padronização dos ensaios cometa e micronúcleos para as células da hemolinfa deste organismo. Uma alternativa de controle positivo para o ensaio cometa utilizando radiação ultravioleta também é testada com sucesso. Neste mesmo capítulo, é avaliada a sensibilidade deste molusco a possíveis contaminantes ambientais e a amostras ambientais, sendo ainda evidenciada a atividade do sistema de reparação deste organismo. Estes ensaios permitiram assegurar o potencial do mexilhão dourado como organismo biomonitor. No segundo trabalho (capítulo 2), encaminhado à revista Environment International, está descrita a aplicação do *L. fortunei* no biomonitoramento da região de foz dos rios formadores do Lago Guaíba. Os indivíduos foram expostos em condições de laboratório, sendo

também avaliada a presença de elementos inorgânicos no corpo mole dos mexilhões. Novamente foi possível evidenciar uma maior indução de genotoxicidade/mutagenicidade pelas amostras contaminadas predominantemente por efluentes urbanos. A última parte deste trabalho, a ser submetida ao periódico Aquatic Toxicology, teve foco na avaliação do potencial mutagênico em diferentes compartimentos ambientais nos pontos de coletas dentro do lago Guaíba, localizados próximo a locais de liberação de esgoto urbano. Este terceiro capítulo descreve a análise por método direto de amostras de água superficial e lixiviado do sedimento utilizando o ensaio *Salmonella*/microssoma. Animais (*L. fortunei*) expostos *in situ* também foram avaliados, sendo estes resultados comparados com a exposição em laboratório. Os resultados com biomonitoramento apontaram mais claramente a presença de contaminantes genotóxicos/ mutagênicos nas amostras avaliadas. Na realidade, este trabalho nos leva a sugerir a aplicação de métodos de extração, concentração e aplicações de outros ensaios *in vitro* para analisar as amostras de água e sedimento. Como complemento, seria ainda interessante a avaliação química da presença de contaminantes orgânicos, gerando assim perspectivas para trabalhos futuros.

I Introdução

O Estado do Rio Grande do Sul é dividido em três regiões hidrográficas: Região Hidrográfica da bacia do Rio Uruguai, Região Hidrográfica da bacia do Lago Guaíba e Região Hidrográfica das bacias Litorâneas. Dentre estas, a Região Hidrográfica da bacia do Lago Guaíba é considerada a mais importante devido as suas características sócio-econômicas, como descrito a seguir.

1 Região Hidrográfica do Lago Guaíba

A Região hidrográfica do Lago Guaíba, situada no estado do Rio Grande do Sul, é a mais importante do Estado, drenando uma área de 82.842km². Esta é formada por 9 sub-bacias (Guaíba, Gravataí, Sinos, Caí, Taquarí-Antas, Alto Jacuí, Vacacaí-Vacacaí Mirim, Pardo e Baixo Jacuí), em cuja área moram aproximadamente 5,9 milhões de habitantes, abrangendo 251 dos 497 municípios existentes no Estado (Figura 1) (CONCREMAD, 2005).

Estão localizadas na área dessa bacia 8.236 atividades industriais (PRÓ-GUAÍBA/FEPAM, 1997). Dentre essas, estão as que constituem os principais setores produtivos do Estado: siderurgia, refinaria de petróleo, indústrias de cimento, papel, celulose, petroquímica, extração carbonífera, lavouras, setor coureiro-calçadista e metal-mecânico (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RS – PRÓ GUAÍBA, 1998). Esses setores são responsáveis por 86% do produto interno bruto (PIB) do Rio Grande do Sul e 6,54% do PIB do Brasil. Em suas margens ainda estão presentes zonas de agricultura intensiva e regiões urbanas, incluindo a região metropolitana da capital, Porto Alegre. Segundo o Programa Pró Guaíba (Programa de Desenvolvimento Sócio Ambiental da Região Hidrográfica da Bacia do Guaíba), são liberados diariamente na região 3.700 toneladas de lixo domiciliar, 16.500 litros de agrotóxicos, 890 m³ de resíduos industriais, 960.000 m³ de esgoto (PRÓ

GUAÍBA, 2006).

As águas da bacia do Lago Guaíba são utilizadas como fonte de abastecimento para cerca de um milhão de habitantes (97% da população de Porto Alegre) e uma importante via de navegação, pois ligam o centro do Estado ao porto de Rio Grande. São ainda utilizadas para recreação, pesca, irrigação, habitat de espécies, fonte de lazer, turismo e harmonia paisagística (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998).

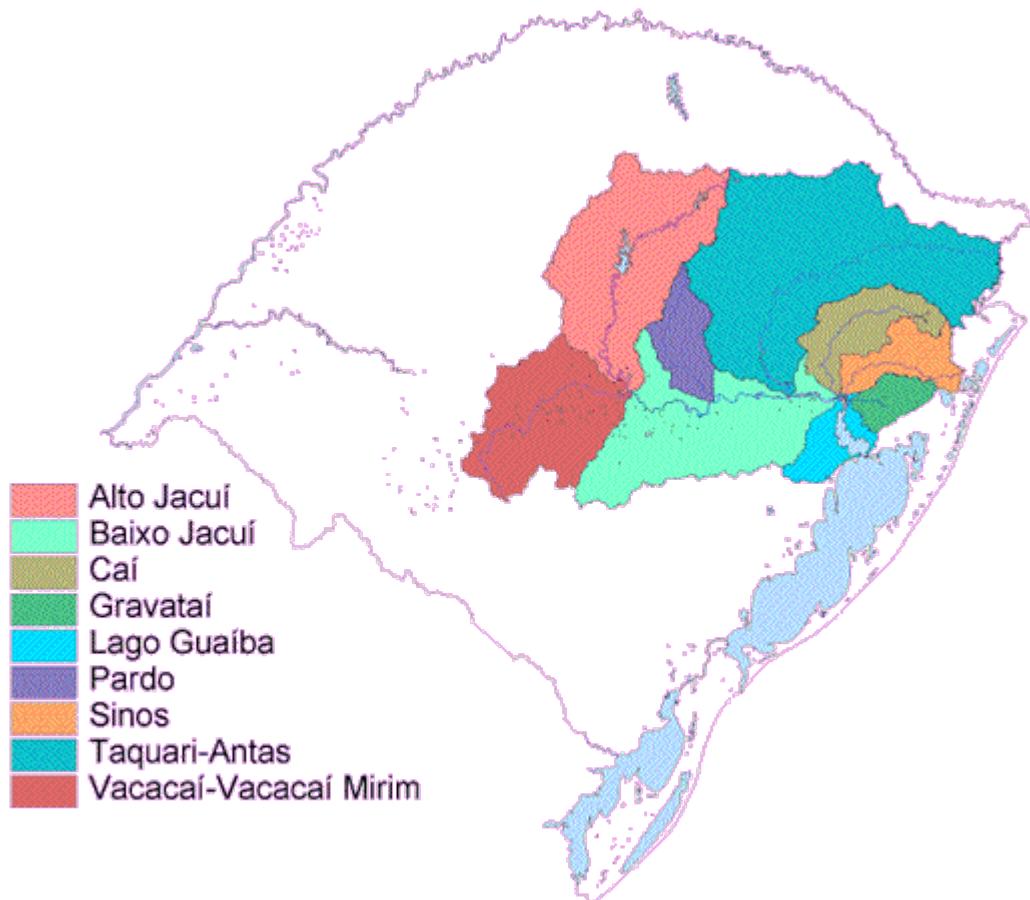


Figura 1: Região Hidrográfica do Lago Guaíba e suas sub-bacias (PRÓ GUAÍBA, 2006)

Esta bacia possui a representação dos principais ecossistemas do Rio Grande do Sul, com exceção da costa litorânea. Diferentes paisagens, como por exemplo, as terras altas, a planície, as matas de araucária, as matas baixas dos vales e os banhados, estão representados nesta área que concentra 28 unidades

de conservação. Dentre estas, pode-se salientar a Reserva da Serra Geral, que abriga uma significativa mostra da mata atlântica, o Arquipélago do Delta do Jacuí, que abriga uma enorme diversidade de espécies, e o Parque de Itapuã, composto por um mosaico de ecossistemas que incluem campos, areias, restingas, ilhas, praias e morros, que servem de refúgio para diversas espécies, estando muitas delas em extinção (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998).

1.1 Sub-bacias da região Hidrográfica do Guaíba

Cada uma das 9 sub-bacias que compõem esta região hidrográfica, possui uma ocupação predominante, conforme descrito a seguir.

1.1.1 Sub-bacia do Rio Vacacaí-Vacacaí Mirim

O rio Vacacaí nasce em São Gabriel, passando por Santa Maria até desembocar no rio Jacuí. O solo desta região é ocupado preponderantemente por latifúndios, onde são desenvolvidas a agricultura e a pecuária extensivas, com destaque para o cultivo de arroz. A bacia tem o menor parque industrial da Região Hidrográfica. Os principais municípios são Santa Maria, São Sepé e São Gabriel. O cultivo do arroz irrigado coincide com a época de menor disponibilidade de água, gerando o principal conflito de uso da região (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; PRÓ GUAÍBA, 2006).

1.1.2 Sub-bacia do Rio Pardo

A principal demanda de água nesta Bacia é para as lavouras de arroz irrigado, chegando a 90% do total dos recursos hídricos entre os meses de dezembro e fevereiro, justamente na época de baixa vazão do rio. A produção de tabaco também é uma atividade importante, causando grande impacto ambiental

devido ao uso de agrotóxicos. A irrigação é o principal uso das águas desta sub-bacia (PRÓ GUAÍBA, 2006).

1.1.3 Sub-bacia do Alto Jacuí

É a nascente do Jacuí, rio responsável por 85% das águas que formam o lago Guaíba. Durante seu percurso, este rio passa por regiões em que prevalecem características geográficas e sócio-econômicas distintas, havendo forte influência de atividades agrícola, mineraria de pedras preciosas e industriais. Além disto, o rio sofre represamento pelas barragens de Passo Real, Ernestina e Itaúba, na região a montante de Salto Jacuí. Estas águas são utilizadas principalmente para navegação e abastecimento (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; PRÓ GUAÍBA, 2006).

1.1.4 Sub-bacia do Baixo Jacuí

Após a confluência com o rio Vacacaí, o Jacuí segue até sua foz, no Delta do Jacuí, junto à cidade de Triunfo. A região ao longo do curso médio sofre muitas interferências causadas pela atividade antrópica, sendo característica a mineração de carvão mineral. No seu curso inferior, é característica a atividade urbano e industrial, indiretamente pelo Polo Petroquímico, indústria química, de plástico, borracha, siderurgia e produtos alimentares. Ao longo do seu percurso, estão presentes a produção de soja, milho, trigo e arroz, sendo esta região conhecida como celeiro do estado. É utilizado para navegação e como local de recreação (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; PRÓ-GUAÍBA 2006).

1.1.5 Sub-bacia dos Rios Taquarí-Antas

O rio Taquarí e o rio das Antas são os principais cursos de água formadores

desta sub-bacia, também de grande expressividade territorial, sócio-econômica (20% do PIB estadual) e populacional (16% da população do estado). Na nascente do rio das Antas predomina a atividade pecuária. Esta utilização se modifica ao longo do rio, passando a predominar a atividade agrícola, intensivamente praticada em pequenas propriedades, onde ocorrem densidades populacionais mais altas. A partir da sua confluência com o rio Turvo, este rio passa a se denominar rio Taquarí, agora com maior expressão em termos de volume, indo desembocar no rio Jacuí, na região de Triunfo. Nesta bacia, há um grande impacto ambiental causado pelo uso de agrotóxicos na cultura da maçã, e pelo despejo de esgotos da aglomeração urbana localizada no nordeste do estado. Ao longo dele também estão concentradas as atividades de vinicultura, metalurgia, mecânica, madeira, vestuário e artefatos de tecido, produtos alimentares, calçados, minerais não metálicos e da indústria moveleira. As principais culturas são milho e soja, sendo também cultivados arroz e hortifrutigrangeiros, sendo o sulfato de cobre utilizado na viticultura uma importante fonte de contaminação nesta região. Esta sub-bacia possui diversos usos: abastecimento doméstico, diluição de efluentes, recreação, turismo, pesca comercial, produção de energia, irrigação, dessedentação animal, navegação e preservação de espécies (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; FEPAM, 1999; PRÓ GUAÍBA, 2006).

1.1.6 Sub-bacia do Rio Cai

Esta sub-bacia apresenta diferentes tipos de impacto ambiental, como o grande volume de esgotos doméstico da região de Caxias do Sul, na serra gaúcha. O relevo acidentado da região dificulta o depósito da água da chuva, impedindo a diluição dos resíduos e diminuindo a disponibilidade de água para as atividades agrícolas. Em Triunfo, o rio sofre influência do Pólo Petroquímico do Sul. Há ainda impacto ambiental em Feliz, causado pelos agrotóxicos usados na cultura do morango. Também são importantes os setores coureiro-calçadista e o

metal mecânico, pois na região serrana está localizado um dos principais pólos brasileiros de autopeças (PRÓ-GUAÍBA, 2006). Dentro dos três trechos característicos deste rio (superior, médio e inferior), os principais usos da água consistem em geração de energia elétrica, recreação, diluição de esgoto industrial e urbano, abastecimento doméstico e industrial, irrigação, navegação e mineração (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; FEPAM, 1998).

1.1.7 Sub-bacia do Rio dos Sinos

A bacia do Sinos sofre, nos cursos médio e baixo, forte ação antrópica ocasionada por uma intensa concentração urbano-industrial e tem o maior parque industrial, com destaque para a indústria coureiro-calçadista além de uma refinaria de petróleo. A cultura predominante nesta região é a do arroz, além de cana-de-açúcar e hortaliças com uma pecuária pouco desenvolvida de gado leiteiro, suínos e aves. Assim como a maioria das sub-bacias do Guaíba, os principais usos da água consistem em geração de energia elétrica, recreação, harmonia paisagística, preservação de espécies, diluição de esgoto industrial e urbano, abastecimento doméstico e industrial, irrigação, navegação e mineração (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; FEPAM, 1999a; PRÓ GUAÍBA, 2006).

1.1.8 Sub-bacia do Rio Gravataí

A sub-bacia do Gravataí é de pequena dimensão, sem afluentes de porte em termos de vazão, e desemboca no Delta do Jacuí. Incapaz de realizar a regulação natural de sua vazão, o rio Gravataí é considerado o mais sensível da região. O Banhado Grande, que funciona como uma esponja regulando as vazões à montante, foi bastante impactado pelas lavouras de arroz irrigado, com a consequente redução da capacidade de acumulação de água. Nesta sub-bacia predominam atividades tipicamente rurais nas áreas de várzeas, com destaque

para a cultura de arroz, a pecuária e o uso urbano-industrial intenso a jusante da cidade de Gravataí, sendo de grande importância o fato de cortar a região metropolitana de Porto Alegre. As principais indústrias são a automobilística, mecânica, de produtos alimentares e bebidas. As águas do rio servem para irrigação, abastecimento público e recepção de despejos domésticos e industriais (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; FEPAM, 1996; PRÓ-GUAÍBA, 2006).

1.1.9 Sub-bacia do Lago Guaíba

Os rios Gravataí, Sinos, Caí e Jacuí contribuem para a formação do Lago Guaíba, que, por sua vez, margeia os municípios de Porto Alegre, Eldorado do Sul, Guaíba, Barra do Ribeiro e Viamão, desembocando na Laguna dos Patos, limite sul da Região Metropolitana de Porto Alegre. O arroio Dilúvio, assim como outros pequenos corpos d'água, também desembocam diretamente no Guaíba, tornando o lago o destino final de todas as sub-bacias que formam a região hidrográfica. O Lago Guaíba recebe efluentes das cidades de Porto Alegre, Guaíba, Eldorado do Sul, Barra do Ribeiro e Viamão, sendo diretamente liberado em suas águas uma grande quantidade de esgoto. As principais indústrias localizadas no lago são de produtos alimentares, metalurgia e celulose. Estas águas são utilizadas como fonte de abastecimento para cerca de um milhão de habitantes, e uma importante via de navegação. São ainda utilizadas para recreação, pesca, irrigação, habitat de espécies, fonte de lazer, turismo e harmonia paisagística (SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; PRÓ GUAÍBA, 2006).

2 Contaminação dos Corpos Hídricos

Desde o início dos tempos o homem tenta controlar, dominar e adaptar ao seu gosto o ambiente em que vive. Com o avanço da tecnologia, foram criados mais subsídios com os quais os seres humanos buscaram melhorar sua

qualidade de vida, com a consequente alteração do ambiente. Neste processo de desenvolvimento, agentes físicos e químicos são utilizados em larga escala e lançados no ambiente na forma de dejetos industriais, domésticos e agrícolas. Mesmo sendo obrigatória a avaliação do impacto que estas substâncias podem causar no ecossistema, elas continuam sendo liberadas, muitas vezes sem serem tomados os cuidados necessários, principalmente por envolverem altos custos. Como consequência, estes compostos podem ocasionar efeitos nocivos ao ambiente atingindo o próprio homem que os produziu e liberou. Mesmo com os esforços empregados na identificação das substâncias e/ou dos produtos tóxicos liberados no ambiente, é praticamente impossível evitar o contato dos seres vivos com esses xenobióticos, mas é possível buscar controlar doses e diminuir exposições, dependendo no entanto, do conhecimento do perigo que cada agente representa (ARNAIZ, 1997; AZEVEDO & CHASIN, 2004).

2.1 Poluição das Águas

A água é de fundamental importância para os seres vivos, uma vez que plantas e moluscos, por exemplo, são formados por 90% de água e os seres humanos por 70%. Os corpos d'água diluem e carregam facilmente os mais diversos poluentes, que podem ser provenientes dos solos e do ar lavados pelas chuvas, ou que são neles lançados diretamente pela ação antrópica.

A contaminação da água tem diferentes fontes, como resíduos da vida urbana e rural ou da indústria. Diariamente, grandes volumes de esgoto não tratado são lançados diretamente aos corpos de água. A indústria utiliza em seus processos uma enorme quantidade de água, que muitas vezes são devolvidas ao ambiente com sua qualidade comprometida. Outra importante fonte de contaminação da água é gerada pela liberação de pesticidas (ARNAIZ, 1997; OHE *et al.*, 2004).

O impacto sofrido pelos rios que recebem descargas tóxicas é determinado pelo tipo e concentração dos agentes introduzidos, a duração do lançamento, o tipo de exposição, a capacidade do ecossistema para resistir a estas mudanças, o

tempo necessário para o retorno ao estado de equilíbrio, após remoção do composto, e a localização do ecossistema em relação ao local de deposição da substância (LEMOS & TERRA, 2003). A presença de poluentes na água, além de afetar os organismos que habitam nela, pode também repercutir em organismos não aquáticos via cadeia alimentar ou simplesmente como resultado da ingestão de água contaminada (GAUTHIER *et al.*, 2004).

A contaminação do ambiente por agentes agudamente tóxicos é facilmente detectada devido ao efeito imediato, permitindo controle rápido da fonte emissora. Substâncias tóxicas que atuam de forma crônica produzem danos a longo prazo, reduzindo a sobrevivência dos organismos, influenciando na sua reprodução, ou ainda, alterando o patrimônio genético. Algumas vezes, estes efeitos podem vir a ser detectados muitos anos depois da exposição, dificultando a associação com os agentes causadores e permitindo que muitas pessoas sejam expostas por muito tempo. Para evitar este efeito são necessárias ações preventivas (AZEVEDO & CHASIN, 2004).

Os agentes xenobióticos podem ser classificados conforme o tipo de influência que exercem sobre os organismos. Os compostos *genotóxicos* são todos aqueles que lesam o genoma, que é o conjunto do material genético de célula. São denominados *mutagênicos* agentes que induzem a fixação de uma mutação estável no DNA, isto é, alteram de alguma forma a seqüência de nucleotídeos que formam o DNA, sendo esta alteração transmitida para futuras gerações celulares. Contaminantes ambientais que modificam o genoma podem tanto atuar no número ou na estrutura dos cromossomos quanto em um único gene (BOURDON, 1999). Mutações gênicas, por exemplo, não são detectadas nas gerações em que ocorreram, e somente quando são do tipo dominante é que serão observadas na geração subsequente. Os compostos *carcinogênicos* são os agentes que atuam em qualquer etapa do processo de carcinogênese (nas fases de iniciação, fixação ou promoção). Como diversas mutações podem influenciar nessas etapas, compostos genotóxicos e/ou mutagênicos também podem possuir potencial carcinogênico (ARNAIZ, 1997).

Uma vez lesado seu DNA, a célula responde utilizando diferentes estratégias de ação, tais como: morte por citotoxicidade ou apoptose, modulação da expressão gênica para controle do ciclo celular e reparação do material genético, por via livre ou sujeita a erro, sendo a segunda responsável pela fixação das mutações. Normalmente é a combinação destes fatores que compõe a resposta a danos genéticos (AZEVEDO & CHASIN, 2004).

2.2 Poluição na Região Hidrográfica do Guaíba

Entre os principais problemas enfrentados na bacia do Lago Guaíba estão a liberação de esgoto doméstico, do qual apenas 25% é tratado, o uso indiscriminado de agrotóxicos, desmatamento às margens dos rios, erosão do solo e conseqüente assoreamento dos cursos d'água, poluição industrial e depredação pela retirada de areias (FEPAM/GTZ, 1997; SECRETARIA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO RGS – PRÓ GUAÍBA, 1998; PRÓ GUAÍBA, 2006).

As águas da região hidrográfica do lago Guaíba foram classificadas utilizando dois sistemas: O IQA (Índice de Qualidade de Água) e com base na resolução nº 357/05 do Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente) (BRASIL, 2005).

O IQA é uma forma simplificada de apresentação das condições da qualidade da água. O cálculo é feito considerando os valores dos seguintes parâmetros: oxigênio dissolvido (OD), coliformes fecais, pH, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), fosfato total, nitrato, turbidez e sólidos totais. O IQA pode ser enquadrado nas seguintes faixas: Muito Ruim (0 – 25); Ruim (26 – 50); Regular (51 – 70); Bom (71 – 90); Excelente (91 – 100) (BENDATI *et al.*, 2000).

O sistema de classificação baseado na resolução nº 357/05 do Conama (BRASIL, 2005) estabelece a qualidade das águas superficiais de acordo com seu uso. O Lago Guaíba foi inicialmente classificado como classe 2, compatível com águas destinadas ao abastecimento doméstico após tratamento convencional, à

proteção das comunidades aquáticas e à recreação de contato primário, entre outros (BENDATI *et al.*, 2000). Porém, esta informação foi revista, pois cada corpo d'água formador do Lago Guaíba apresenta uma classificação própria.

Os critérios utilizados pelos dois sistemas de classificação são os mesmos, como pode ser constatado na Tabela 1, a qual apresenta as classificações do Guaíba e dos seus principais afluentes. É possível observar diferenças na qualidade das águas das diferentes regiões, o que está relacionado com as interferências que estes cursos hídricos sofrem ao longo de seus percursos, sendo os mais prejudicados aqueles contaminados por uma maior atividade industrial e urbana.

Tabela 1: Classificação do Lago Guaíba e seus principais afluentes.

Corpos d'água	Índice de Qualidade de água	CONAMA nº 357/05
Rio Gravataí	Muito ruim	classe 4
Rio dos Sinos	Regular	classe 4
Rio Caí	Regular	classe 3
Rio Jacuí	Boa	classe 2
Rio Taquari-Antas	Entre regular e boa	ND ¹
Arroio Dilúvio	Entre muito ruim e ruim	classe 4
Lago Guaíba PC	Muito ruim	classe 4
Lago Guaíba BR	Regular	ND
Itapuã	Boa	ND

¹ND: não disponível. Fonte: FEPAM (2006); CONCREMAD (2005).

Buscando uma avaliação mais completa do que a exigida pela legislação vigente, o potencial mutagênico das águas e sedimentos da bacia do Lago Guaíba vem sendo avaliado e monitorado em diversos estudos.

VARGAS *et al.* (1988; 1992; 1993; 1995) e LEMOS *et al.* (1994) avaliaram as águas superficiais do Rio Caí utilizando o teste *Salmonella*/microssoma por método direto e concentrando as amostras. Nestes estudos, foi possível inferir que a mutagenicidade encontrada seria uma consequência da liberação dos efluentes do Pólo Petroquímico neste rio. A linhagem TA98, na ausência de metabolização, apresentou maior sensibilidade às amostras analisadas, indicando a prevalência nessas águas de compostos de ação direta que causam mutações do tipo defasagem no quadro de leitura. Foram ainda detectados mutágenos

voláteis, que induziram mutagênese pelo método direto, mas que eram perdidos no processo de extração líquido - líquido. Segundo os autores, a obtenção de resultados positivos em águas tomadas como controle, recolhidas antes da liberação de efluentes do Polo Petroquímico foi atribuída à provável presença de pesticidas, que escoam das lavouras localizadas às margens do Rio Caí. Resultados similares, na zona de influência do Polo Petroquímico, foram verificados também pela utilização de testes de detecção de troca de cromátides irmãs (SCE) em linfócitos humanos (LEMOS *et al.*, 1994) e ainda em estudo de análise da freqüência de micronúcleos em linfócitos humanos (LEMOS & ERDTMANN, 2000). Empregando o teste para a detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster* (SMART), em diferentes locais de coleta ao longo do rio Caí, SILVA (2000) e AMARAL *et al.* (2005a) observaram atividade genotóxica em amostras sob influência da liberação de efluentes urbanos, não sendo observado o mesmo para as amostras contaminadas por efluentes industriais.

VARGAS *et al.* (2001) mostraram que as águas superficiais e intersticiais do rio dos Sinos não apresentam resposta mutagênica positiva com o teste *Salmonella/microssoma*. Entretanto, amostras de sedimento deste rio apresentaram resposta positiva frente a linhagem TA97a (que detecta mutágenos que causam defasagem no quadro de leitura), na ausência de ativação metabólica. Complementando este estudo, VARGAS *et al.* (2001) encontraram resultados genotóxicos positivos em amostras de água e sedimento desse rio, com o teste de Microtriagem por Indução Lisogênica. Por ser um teste sensível a detecção de genotoxicidade induzida por metais, esses foram inferidos como uma das prováveis fontes de contaminação, além de compostos orgânicos.

O arroio Dilúvio foi avaliado em toda a sua extensão utilizando ensaio cometa em Planárias, sendo observado o aumento no gradiente de dano em direção a foz do arroio, possibilitando estabelecer uma correlação entre a urbanização e aumento de danos no DNA. Este resultado também pode ser relacionado com histórico de dados fisico-químicos, sendo encontrada uma forte relação entre a

atividade genotóxica e os níveis de nitratos. Os autores consideraram o NO₃ como o melhor marcador químico associado a genotoxicidade (PRÁ *et al.*, 2005).

Quanto ao Lago Guaíba, as amostras de água superficial avaliadas com o ensaio *Salmonella*/microssoma (ROLLA, 1995; ROLLA & HENRIQUES, 1996; 1997) e com o teste de aberrações cromossômicas em medula de camundongos (GUIMMLER-LUZ *et al.*, 1992) não induziram mutações gênicas nem cromossômicas. Entretanto, amostras de sedimentos analisadas pelo ensaio *Salmonella*/microssoma (ROLLA, 1995; ROLLA & HENRIQUES, 1996; 1997) apresentaram resposta mutagênica positiva com a linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica, em pontos de coleta próximos a locais de liberação de esgoto urbano. Em uma avaliação da foz dos rios formadores do Guaíba e do próprio Lago Guaíba, utilizando o ensaio *Salmonella*/microssoma, VILLELA (2001) também encontrou como principal local de liberação de compostos genotóxicos uma saída de esgoto urbano. Estes mesmos locais de coleta foram avaliados utilizando o teste SMART, sendo encontrados resultados positivos relacionados principalmente a recombinação homóloga mitótica em amostras das regiões de foz dos rios Caí, Taquari e Jacuí, na foz do arroio Dilúvio e no Lago Guaíba no local conhecido como Ponta da Cadeia (AMARAL *et al.*, 2005b).

Assim, a eminent crise da água alerta a comunidade em geral para a importância de se avaliar a qualidade dos corpos d'água. Neste sentido, diversos esforços têm sido direcionados para a avaliação do potencial genotóxico em águas potencialmente contaminadas, e os consequentes efeitos aos organismos aquáticos.

3 Avaliação da Genotoxicidade

Os primeiros estudos utilizando testes de curta duração na detecção de potencial mutagênico, realizados nos anos 70, estabeleceram uma forte correlação entre mutagênese e carcinogênese (WATERS *et al.*, 1999). Porém, com o avanço dos modelos de Biologia Molecular, foi descoberto que o processo

de carcinogênese é bem mais complicado do que inicialmente se pensava, podendo estar relacionado a eventos genotóxicos, não genotóxicos ou ambos combinados com a maior atuação de um dos mecanismos (WATERS *et al.*, 1999; CAIRNS, 2000). Fatores tais como tempo de exposição e interações não genotóxicas tornam claro por que testes de curta duração não modelam todos os aspectos do processo carcinogênico (WATERS *et al.*, 1999). Quanto maior o número de compostos estudados, maior o número de carcinógenos não mutagênicos conhecidos, diminuindo a correlação inicialmente estabelecida entre estes dois eventos (ASHBY & TENNANT, 1991; WHITE & RASMUSSEN, 1996; CLAXTON *et al.*, 1998; WATERS *et al.*, 1999; ZEIGER, 2001). No entanto, os ensaios de curta duração que avaliam genotoxicidade em procariotos ainda são bastante utilizados. O teste *Salmonella*/microssoma, por exemplo, fornece uma correlação de 50 a 90% entre mutagênese e carcinogênese, dependendo do grupo químico ao qual a substância estudada pertence. Outra maneira de avaliar a carcinogênese é empregando testes que detectam mutações cromossômicas *in vivo*, tais como aberrações cromossômicas e micronúcleos, que estão fortemente ligados à indução de câncer. Porém, os únicos testes que podem realmente detectar carcinogênese são os testes realizados em mamíferos, que em geral têm duração de 2 anos e envolvem um alto custo (ZEIGER, 2001).

A maioria dos testes genéticos buscam agentes que possam afetar o genoma. Devido à universalidade do código genético, se um agente pode causar danos ao DNA, este tem potencial genotóxico em qualquer tipo de célula (animal, vegetal ou em microorganismos). Porém, organismos diferentes possuem metabolismos e mecanismos de reparação e de detoxificação que variam consideravelmente, tornando também diferentes suas respostas a agentes genotóxicos. Para amenizar este problema e suprir a necessidade de informações em mutagênese e carcinogênese humana, foram criadas estratégias de avaliação utilizando tanto testes *in vitro* como *in vivo*. No entanto, a extração de dados entre diferentes organismos não é simples, tornando difícil a avaliação de risco. Assim, vários métodos foram desenvolvidos com o objetivo de detectar o potencial genotóxico de químicos e amostras ambientais, sendo constante o

aprimoramento das estratégias de avaliação a serem empregadas (BRUSICK, 1988; VILLELA *et al.*, 2003).

Tentar definir as classes de compostos mutagênicos em misturas complexas presentes no ambiente é uma tarefa difícil. Isto se deve à ocorrência de interação entre os compostos. Não se pode prever o tipo de alteração que um composto sofre quando interage com diversos outros. Isto dá a cada amostra uma característica específica (DONNELLY *et al.*, 2004). Porém, este fato não invalida a tentativa de se descobrir a presença de compostos relacionados com a genotoxicidade em amostras ambientais. Este tipo de informação pode assessorar uma política ambiental no sentido de prevenir ou remediar a contaminação ambiental. Para estas análises, são utilizadas as mais variadas técnicas bioquímicas, químicas e até mesmo físicas. Muitos esforços têm sido empregados neste sentido, e já foram identificados por diversos pesquisadores metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas e pesticidas, entre outros contaminantes diretamente relacionados com a indução de danos ao DNA. No entanto, uma maior identificação de compostos com alta atividade genotóxica/mutagênica em águas ao redor do mundo ainda não foi realizada (OHE *et al.*, 2004).

Várias estratégias foram propostas por diversos pesquisadores, órgãos de pesquisa e agências governamentais. A seleção dos testes a serem utilizados é de fundamental importância para o sucesso das mesmas. Neste contexto, cada vez mais são necessários novos testes para serem enquadrados nas estratégias de avaliação de risco que atendam às necessidades da vida contemporânea (BRUSICK, 1988; VILLELA *et al.*, 2003). O monitoramento ambiental, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes (biomonitores), utilizando sistemas testes biológicos (biomarcadores), propiciam ferramentas promissoras para a identificação de poluentes capazes de causar dano a saúde humana e ao ambiente (PEAKALL, 1992; SILVA *et al.*, 2003).

A escolha do tipo de ensaio(s) que será(ão) realizado(s) em determinado estudo está diretamente relacionada com a pergunta que se quer responder.

Existem diversos métodos laboratoriais amplamente usadas para a detecção de genotoxicidade ambiental, tanto *in vitro* como *in vivo*. Cada uma delas fornece uma contribuição muito importante na avaliação da qualidade ambiental. O ensaio mais apropriado e/ou um organismo biomonitor diretamente exposto e com maior sensibilidade deve ser selecionado dependendo do enfoque e do compartimento ambiental que se pretende avaliar. Esta escolha é de fundamental importância para o sucesso do monitoramento, pois tanto os biomarcadores (ensaços) quanto os biomonitores (organismos) possuem especificidades diferentes, sendo cada um mais apropriado para cada situação. Para as análises, podem ser usadas amostras brutas ou tratadas de água, solo, ar ou material biológico, conforme a necessidade específica de cada ensaio. Alguns destes bioensaios são mais utilizados devido às suas características de padronização, praticidade, baixo custo ou por poderem ser aplicadas em diferentes organismos (BUTTERWORTH *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2003).

Existem três principais situações que podem levar a uma avaliação do potencial genotóxico: (1) quando existem razões para se acreditar que espécies nativas estão ameaçadas; (2) quando há implicações para a saúde humana quanto ao consumo de organismos potencialmente afetados; e (3) quando existe o interesse em se determinar a qualidade ambiental (BUTTERWORTH *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2003). Há um grande crescimento no interesse em biomonitorar e biomarcar os compartimentos aéreo, terrestre e aquático quanto à exposição a agentes danosos, e quanto ao risco de exposições ocupacionais humanas.

Embora ligações diretas entre efeitos ecológicos e a saúde humana tenham se mostrado difíceis de estabelecer, o uso de espécies da fauna nativa como sentinelas de problemas ambientais é a base conceitual para esta conexão. Cientistas, administradores de recursos e médicos especialistas, hoje em dia, aceitam amplamente a idéia de que a sociedade humana é dependente de um ambiente saudável e que a contínua degradação ambiental ameaça a qualidade de vida (PEAKALL, 1992; SILVA *et al.*, 2003).

Em revisão sobre mutágenos em águas superficiais, OHE *et al.* (2004) enfatizam a importância do ensaio *Salmonella*/microssoma (Teste de Ames) como o mais utilizado em monitoramento ambiental. Também foram salientados muitos estudos aplicando o ensaio cometa (Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE) e o teste de micronúcleos em diferentes organismos, sendo estes considerados suficientemente sensíveis para avaliação ambiental.

4 Biomarcadores deste estudo

Foram utilizados três biomarcadores durante a realização deste estudo: teste de *Salmonella*/microssoma, ensaio cometa e teste de micronúcleos.

4.1 Teste de *Salmonella*/microssoma

O teste *Salmonella*/microssoma (Teste de Ames), desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70 (AMES *et al.*, 1975), é um ensaio bacteriano de curta duração, que busca identificar substâncias causadoras de danos genéticos que possam evoluir a mutações (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Este ensaio baseia-se na indução de mutações reversas. Um gene que possui uma mutação sofrerá outra mutação que reverterá o mesmo ao seu estado original. Para tanto, são utilizadas linhagens de *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* auxotróficas para o aminoácido da histidina ou triptofano, respectivamente, que por indução de mutação reversa são conduzidas à prototrofia. A freqüência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em placas contendo meio mínimo após a exposição da bactéria a um agente mutagênico. Para ser considerada mutagênica, uma substância deve aumentar significativamente o número de colônias revertentes, lembrando que cada linhagem apresenta uma taxa de reversão espontânea característica (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; VILLELA *et al.*, 2003).

Em bactérias, danos no DNA ou inibição na replicação podem desencadear uma série de alterações fenotípicas, denominadas de Funções SOS. Esta resposta depende da expressão dos alelos selvagens de *recA* e *lexA* e desencadeia a expressão de pelo menos 27 outros genes, muitos dos quais envolvidos em processos de reparação do DNA (Figura 2). Na forma desligada do sistema, a proteína LexA está reprimindo os genes alvo. Quando ocorre um dano no DNA, é emitido um sinal indutor que ativa RecA na presença de ATP. Esta forma ativada da protease RecA promove a auto-clivagem do repressor LexA, em uma ponte Ala – Gly, que resulta na desrepressão do *regulon*, possibilitando a expressão ou superexpressão dos genes alvo controlados pelas funções SOS. Conforme a lesão é reparada, o sistema volta a sua forma desligada (revisado em KONOLA *et al.*, 2000 e KELLER *et al.*, 2001) (Figura 2).

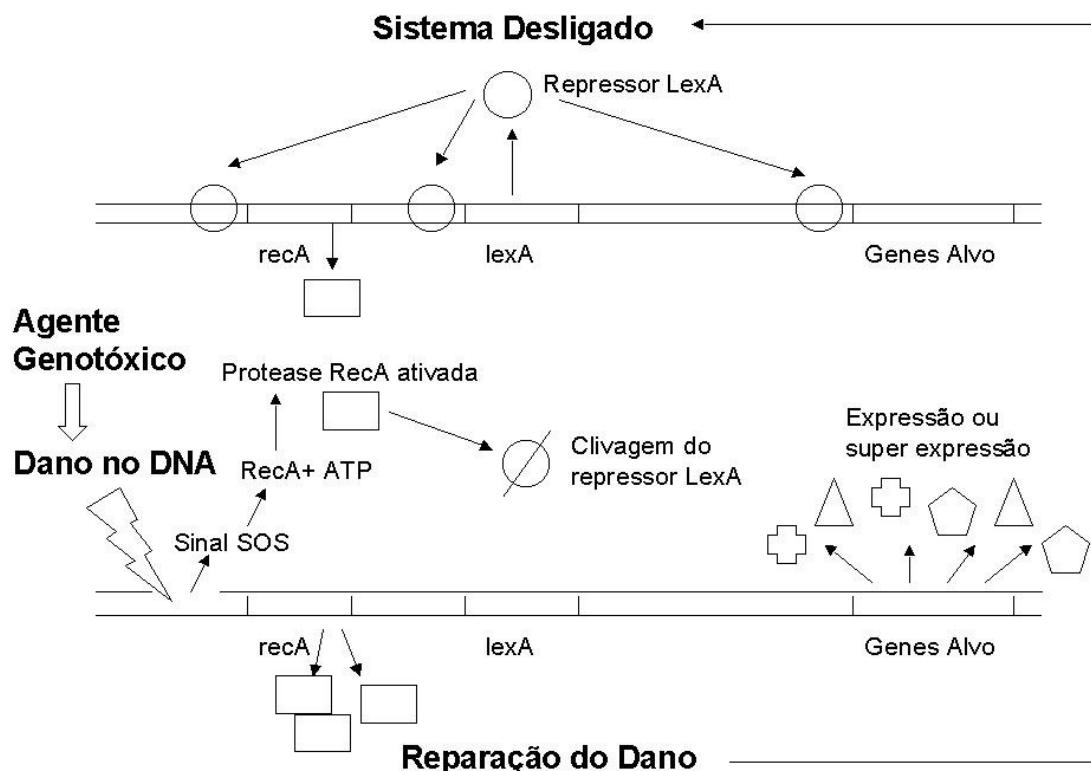


Figura 2: Esquema do funcionamento do sistema regulatório SOS (adaptado de LEITÃO & ALCANTARA GOMES, 1997)

Nas linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella/microssoma*, a resposta SOS é otimizada pela presença do plasmídio

pKM101, carregando os genes *mucAB*, alelos de *umuCD* de bactérias, envolvidos na reparação sujeita a erro. Ao se transformar em co-protease, RecA, além de desreprimir o sistema SOS, também cliva UmuD, gerando uma forma ativada, UmuD', que se complexa com UmuC. Este complexo se liga a sub unidade ε da DNA polimerase I, permitindo que esta realize a síntese translesão, levando, portanto, à mutagênese (LEITÃO & ALCANTARA GOMES, 1997; BHAMRE *et al.*, 2001).

Estas linhagens ainda contam com outras mutações, que também auxiliam a identificação de substâncias que lesam o DNA: mutação no gene *rfa*, que acarreta na perda parcial da barreira de polissacarídeos da parede bacteriana, aumentando a permeabilidade e facilitando a entrada de moléculas maiores na célula; deleção do gene *uvrB*, responsável pelo sistema de reparação por excisão de nucleotídeos (NER) do DNA, o que impede que esta via de reparação esteja atuante nestas linhagens, possibilitando a fixação das mutações (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Cada linhagem de *S. typhimurium* é mutada de forma diferente no operon de histidina, o que permite que tenham especificidade na detecção de um determinado tipo de mutágeno, sendo as linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 as mais utilizadas em amostras ambientais. A linhagem TA98 detecta mutagênicos que causam erro no quadro de leitura do DNA. Apresenta como ponto preferencial de lesão oito resíduos repetitivos GC no operon do gene *his_{d3052}*, que codifica a enzima histidinol desidrogenase (LEVIN *et al.*, 1982a; MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000). A linhagem TA100 detecta mutagênicos que causam substituição de pares de base do DNA, por meio de uma mutação no gene *his_{G46}*, que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina. Tem como ponto preferencial para a reversão o par GC, sendo a mutação uma substituição de uma prolina por uma leucina (BARNES *et al.*, 1982; MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000). A linhagem TA97a, que apresenta uma mutação no operon do gene *his₀₁₂₄₂*, detecta mutagênicos que causam erro no quadro de leitura do DNA. A mutação detectada

por esta linhagem resulta da adição de mais uma citosina no gene da histidina, formando uma seqüência de seis citosinas (C-C-C-C-C-C), que altera o quadro de leitura e, consequentemente, leva à reversão ao caráter prototrófico (LEVIN *et al.*, 1982a; MORTELMANS & ZEIGER, 2000). A linhagem TA102 contém pares de bases AT no sítio mutante da *his_{G428}* introduzidos pela inserção do plasmídio multicópia pAQ1, com objetivo de amplificar o número de sítios alvos. A mutação *his_{G428}* pode ser revertida por seis possibilidades de trocas de pares de bases (transversão/transição). Esta mutação também é revertida por agentes que causam danos oxidativos. Como o gene *uvrB* não foi deletado, a bactéria é proeficiente no sistema de reparação NER (reparo por excisão de nucleotídeos), aumentando assim a sua habilidade para detectar agentes induutores de pontes entre as cadeias do DNA (*interstrand DNA cross-linking*), que são reparadas por esta via de reparo (LEVIN *et al.*, 1982a; MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Em ensaios *in vitro*, um componente importante é o sistema enzimático citocromo P450, que tem a função de mimetizar o metabolismo de mamíferos, permitindo que também seja avaliada a ação genotóxica dos metabólitos dos agentes testados. A função primária deste sistema no organismo vivo é proteger a célula, degradando fisiologicamente substâncias inerentes ao metabolismo celular e detoxificando substâncias estranhas (como por exemplo poluentes ambientais) à célula, transformando-as em produtos inócuos excretáveis. Porém, algumas substâncias inativas, quando em contato direto com a célula (pró-mutágenos), podem gerar intermediários reativos eletrofílicos, que reagem com os centros nucleofílicos do DNA, levando a formação de adutos no DNA (Figura 3).

O sistema enzimático para ensaios *in vitro* mais utilizado é extraído de células de fígado de mamíferos, pré-tratados com o indutor enzimático. Este sistema é denominado Fração S9 e é preparado a partir de fígados de ratos machos Sprague Dawley tratados com Aroclor 1254 (mistura bifenil policlorinada-PCB), o qual induz um conjunto de enzimas do sistema Microssomal hepático que inclui o citocromo P450 (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

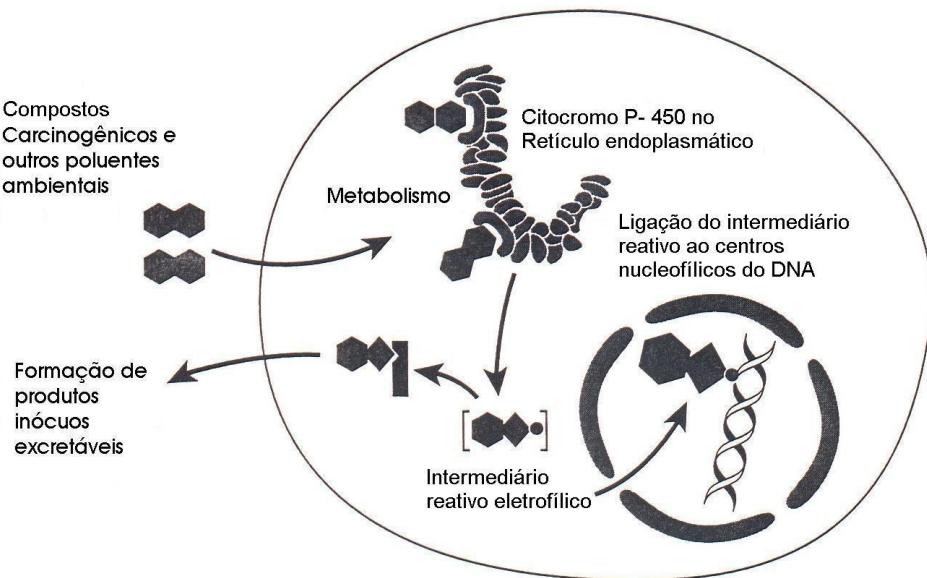


Figura 3: Esquema mostrando ativação metabólica de compostos policíclicos apolares pelo sistema do citocromo P – 450 em uma célula típica de mamífero, formando intermediários reativos que se ligam aos centros nucleofílicos do DNA (adaptado de FRIEDBERG *et al.*, 1995)

4.2 Ensaio Cometa

O ensaio cometa combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células e corresponde a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem rapidez, baixo custo, sensibilidade na detecção de dano no DNA, obtenção de dados em células individuais e o uso de um pequeno número de células para análise. Este ensaio tem a possibilidade de aplicação, teoricamente, em qualquer suspensão de células eucarióticas, independente destas estarem em proliferação ou não (TICE, 1995; LEE & STEINERT, 2003).

O teste cometa ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis test) foi descrito por ÖSTLING & JOHANSON (1984) e o princípio básico do ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização dentro do núcleo. Para a realização do ensaio, as células são imersas em agarose, têm suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, restando apenas o nucleóide (parte de DNA do

núcleo). Quando o DNA é submetido à eletroforese, ele migra no gel de agarose, sendo esta migração relacionada com o tamanho da molécula. Pequenos fragmentos migram com maior velocidade do que a matriz nuclear. Desta forma, células com DNA danificado formam, após a migração, a figura de um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado). A extensão que o DNA migrou está, muitas vezes correlacionada com a quantidade do dano ocorrido, sendo uma cauda mais longa indicação de um grau maior de quebra no DNA (TICE, 1995; COLLINS *et al.*, 1997; LEE & STEINERT, 2003; VILLELA *et al.*, 2003).

O ensaio cometa é um teste de genotoxicidade que detecta danos primários no DNA, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (LEE & STEINERT, 2003; VILLELA *et al.*, 2003). Portanto, é capaz de detectar, em células individuais, quebras simples e duplas de fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompletos, lesões alcalilábeis, danos oxidativos em bases do DNA e crosslinks entre DNA-DNA, DNA-proteína e DNA-droga (SINGH, 2000; BOLOGNESI *et al.*, 2004), sendo possível quantificar o dano mas não identificar com clareza qual desses eventos foi responsável pela indução deste.

Existem dois protocolos principais disponíveis para execução do teste, estabelecidos de acordo com o pH: a) versão neutra (pH 7-8), conforme o método original de ÖSTLING & JOHANSON (1984) que utiliza eletroforese em tampão com pH neutro, que detecta quebras duplas nas moléculas de DNA e “crosslinks”; e b) versão alcalina ($\text{pH} > 13$), desenvolvida por SINGH *et al.* (1998) a partir do método original, que realiza a eletroforese em tampão alcalino, produzindo assim desnaturação do DNA, sendo capaz de identificar quebras de fita única e dupla, sítios alcalilábeis, “crosslinks” e sítios de reparação por excisão. Este protocolo é o mais utilizado por ser o mais abrangente, pois além de detectar danos diretos, torna possível a avaliação de danos indiretos como lesões por metilação e adutos, que, sendo alcalilábeis, se expressam como quebras simples frente ao tratamento alcalino usado no ensaio. Pode ainda ser utilizado o protocolo levemente alcalino com eletroforese em tampão com pH 12,1, que se diferencia do $\text{pH} > 13$ por não

identificar danos alcalilábeis (Tabela 2) (LEE & STEINERT, 2003; VILLELA *et al.*, 2003).

Tabela 2: Relação do pH da eletroforese do ensaio cometa com o tipo de dano no DNA que pode ser detectado

Tipo de dano	pH 7-8	pH 12,1	pH > 13
Quebras duplas de DNA	X	X	X
Quebras simples de DNA		X	X
Reparo por excisão		X	X
Crosslinks	X	X	X
Danos alcalilábeis			X

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas por este teste podem ser reparadas (LEE & STEINERT, 2003; COLLINS *et al.*, 1997).

A análise dos resultados pode ser realizada visualmente em microscópio óptico normal, quando as células são coradas com nitrato de prata, ou em microscópio de fluorescência, quando coradas com brometo de etídeo. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (núcleo) em 4 classes de danos: classe 0: sem cauda (sem dano); classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; e classe 4: cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3 (Figura 4).

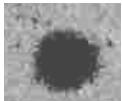
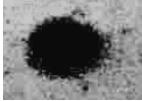
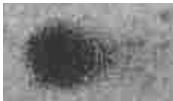
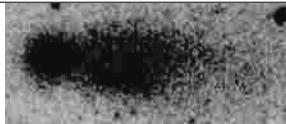
Célula observada	Relação cabeça / cauda	Classe de dano
	Sem cauda	0
	≤ 1	1
	1 – 2	2
	≥ 2	3
	Cauda mais larga que a cabeça	4

Figura 4: Ensaio cometa. Células da hemolinfa do mexilhão *Limnoperna fortunei* exposto a sulfato de cobre, coradas com nitrato de prata, mostrando as diferentes classes de dano (VILLELA *et al.*, 2006).

4.3 Teste de Micronúcleos

Micronúcleos são pequenos corpúsculos celulares compostos por material cromossômico. Após a separação dos cromossomos no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo dando origem a duas novas células. Na citocinese, todo o material cromossômico serve de catalisador para formar membrana nuclear, que é refeita ao redor do conjunto de cromossomos. Se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico não se integra ao conjunto de cromossomos, este também pode constituir um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo. O micronúcleo é, geralmente, resultado de quebras cromossômicas que geram fragmentos sem centrômero ou perda de cromossomos inteiros que não se uniram ao fuso mitótico. Estes micronúcleos podem ter sido causados por agentes físicos, químicos ou biológicos capazes de

interferir no processo de ligação do cromossomo às microfibrilas do fuso (cromossomos inteiros), ou que possam induzir a perda de material genético (fragmentos) (Figura 5). Estes agentes são, portanto, genotóxicos ou mutagênicos. O micronúcleo aparece no final da divisão mitótica, após clastogênese (perda de fragmentos cromossômicos) ou aneugênese (perda de cromossomos inteiros). Por tanto, para visualizar micronúcleos, as células precisam ter passado por um ciclo mitótico (FENECH, 2000; VILLELA *et al.*, 2003).



Figura 5: Micronúcleo em célula da hemolinfa do mexilhão *Limnoperna fortunei* exposto a sulfato de cobre (VILLELA *et al.*, 2006).

A principal vantagem do teste de micronúcleo é a simplicidade do teste e a fácil execução. O fato da análise ser simples e rápida permite que um grande número de células possa ser analisado em um curto espaço de tempo, apenas com o auxílio de um microscópio óptico e um contador de células (FENECH, 2000; VILLELA *et al.*, 2003).

Comparado com ensaios *in vitro*, o teste de micronúcleos *in vivo* apresenta grande relevância ecotoxicológica. Utilizando organismos vivos expostos a um determinado ambiente, a frequência de micronúcleos observada, em um dado momento, pode ser considerada uma resposta complexa entre a atividade genotóxica e a eficiência dos mecanismos de defesa fisiológicos (metabolização dos compostos, eliminação de células afetadas, etc...) (MERSCH *et al.*, 1996).

5 Biomonitor deste Estudo: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)

Bivalves têm sido utilizados no biomonitoramento marinho e de ecossistemas

estuarinos há 20 anos. Esses animais são considerados bons organismos para o biomonitoramento dos efeitos genotóxicos da poluição da água pelo fato de serem filtradores, com ampla distribuição geográfica, terem um ciclo de vida quase inteiramente séssil e com capacidade de acumular altas concentrações dos prováveis contaminantes (KLEIJANS & VAN SCHOOTEN, 2002).

Vários trabalhos são encontrados na literatura utilizando diferentes gêneros de bivalves como organismos teste. MERSCH & BEAUVAIS (1997) mostraram o aumento na freqüência de micronúcleo em hemócitos de *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (mexilhão zebra) transferidos, em armadilhas, para áreas de monitoramento em rios que recebem efluentes industriais contendo compostos genotóxicos. BOLOGNESI *et al.* (2004) avaliaram a influência de desinfetantes na formação de compostos mutagênicos em águas superficiais tratadas para o consumo humano, pelo ensaio cometa e teste de micronúcleos utilizando *D. polymorpha*. RANK & JENSEN (2003), utilizando células branquiais do bivalve *Mytilus edulis*, avaliaram a ação genotóxica do peróxido de hidrogênio, MMS e amostras de água de locais poluídos na costa da Dinamarca, pelo ensaio cometa. PAVLICA *et al.* (2001) verificaram o aumento de danos causados no DNA avaliados pelo ensaio cometa, em células da hemolinfa do mexilhão zebra expostos ao pentaclorofenol assim como em indivíduos mantidos em pontos do Rio Sava, o qual recebe efluentes de uma indústria química e esgoto doméstico. Anteriormente, PAVLICA *et al.* (2000) constataram o aumento da freqüência de micronúcleos induzida por pentaclorofenol no mexilhão zebra. BOLOGNESI *et al.* (1999) investigaram o efeito genotóxico dos metais Cu, Cd e Hg em hemócitos do bivalve *Mytilus galloprovincialis* por eluição alcalina e teste de micronúcleos. PRUSKI & DIXON (2002) investigaram o efeito tóxico do Cádmio em células de brânquias de *M. edulis* pelo ensaio cometa. KLOBUCAR *et al.* (2003) avaliaram a genotoxicidade de amostras ambientais utilizando, no mexilhão zebra, o ensaio cometa e o teste de micronúcleos. FRENZILLI *et al.* (2001) constataram elevados níveis de dano no DNA de *M. galloprovincialis* expostos às amostras de água de locais poluídos no Mediterrâneo, utilizando o ensaio cometa.

O mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (figura 6), é uma espécie de molusco bivalve da família *Mytilidae* e pertencente à mesma família dos denominados “mexilhões marinhos” (*Mytilus* sp). A diferença entre eles é que o *L. fortunei* habita as águas doces, sendo oriundo de rios e arroios da China, no sudeste da Ásia (DARRIGRAN & DRAGO, 2000; DARRIGRAN & DARRIGRAN, 2001).



Figura 6: Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*)

L. fortunei, tal como os mexilhões marinhos, apresenta uma glândula bissogênica cuja secreção endurece em contato com a água e forma numerosos filamentos adesivos que constituem o bisso. Por meio desses, podem fixar-se fortemente em um substrato rígido (DARRIGRAN & DRAGO, 2000). Possui hábito geralmente “epifaunal”, isto é habita sobre todo o tipo de substratos duros, como rochas, restos de troncos, vegetação, valvas de outras espécies e até de indivíduos da mesma espécie (DARRIGRAN & DRAGO, 2000).

Exemplares de *L. fortunei* alcançam 3,5 – 3,8 cm de comprimento de concha, vivendo em média três anos e iniciando a reprodução quando atingem um tamanho de 6 mm; indivíduos adultos são dióicos (sexos separados), com caso de hermafroditismo descrito (DARRIGRAN et al., 1998). O esperma e os óvulos são liberados na água; uma vez que os ovos são fecundados desenvolvem-se e liberam larvas livre natantes que colonizam novos sítios. Os primeiros estágios são de vida livre e posteriormente podem se fixar a um substrato pelo bisso, chegando ao estágio adulto (CATALDO & BOLTOVSKOY, 2000). Estudos sobre a reprodução em populações argentinas sugerem um período reprodutivo de nove

meses ao ano (CATALDO & BOLTOVSKOY, 2000), ou ainda, que este período cobriria o ano todo, com picos reprodutivos relacionados a alterações de temperatura (DARRIGRAN *et al.*, 1998). Este comportamento é peculiar a espécies invasoras, com reprodução contínua nos três a quatro primeiros anos de invasão (DARRIGRAN *et al.*, 1998). Mais recentemente, foi observado nas populações da bacia do Lago Guaíba (RS, Brasil) uma reprodução bianual, evitando os períodos de temperatura máxima e mínima (MANSUR, 2003a; 3003b; MANSUR *et al.*, 2003).

A taxa de filtração de *L. fortunei* varia de 125 - 350 ml indivíduos⁻¹ h⁻¹, dependendo da temperatura e do tamanho dos animais. Animais menores se alimentam mais ativamente, sendo também observada uma associação positiva com a temperatura da água, sendo maior a taxa de filtração em temperaturas mais elevadas. Estas taxas de filtração são maiores do que as registradas para outras espécies invasoras, como *D. polymorpha* e *Courbicula fluminea* (Muller, 1774) (SYLVESTER *et al.*, 2005).

Segundo PASTORINO *et al.* (1993), o primeiro registro desta espécie na América do Sul foi no Rio da Prata, balneário de Bagliardi (34°55'S, 57°59'W), próximo a Buenos Aires, Argentina, em 1991. A introdução teria ocorrido pela água de lastro de navios do sudeste da Ásia, uma vez que a época de aparecimento da espécie na Argentina coincidiu com os picos mais altos de intercâmbio comercial entre aqueles países (DARRIGRAN & PASTORINO, 1995). A ocorrência do bivalve na Bacia do Lago Guaíba foi constatada no final de 1998, sendo registrada a sua presença junto ao porto da cidade de Porto Alegre, localizado na área do Delta do Jacuí, nas praias a jusante do Guaíba e em Itapuã, no município de Viamão, quase no encontro com a Lagoa dos Patos (MANSUR *et al.*, 1999). Atualmente, a dispersão do invasor já alcança o Polo Petroquímico no rio Caí, o porto de Estrela, no rio Taquarí, e a eclusa de Santo Amaro do Sul, no Rio Jacuí (FEPAM, 2006a). Na região sul do estado, já foi encontrado na praia do Laranjal, em Pelotas, e no canal São Gonçalo, que liga a laguna dos Patos a lagoa Mirim, provando ter grande resistência à salinidade (CAPÍTOLI &

BEMVENUTI, 2006).

Segundo DARRIGRAN & PATORINO (1995) e DARRIGRAN & DRAGO (2000), o alto potencial reprodutivo, a falta de inimigos naturais e a fixação por bisso propiciam ao mexilhão dourado a formação de grandes aglomerados de organismos vivos, conhecidos como “macrofouling”. A estes fatores são somados uma grande capacidade de dispersão, já que possui estágio larval livre nadante (diferente do que ocorre com outros moluscos) e grande adaptabilidade ao ambiente. Estas condições fazem com que essa espécie exótica seja considerada uma praga. Suas colônias são responsáveis por inúmeros problemas como entupimento de tubulação de captação com redução do fluxo de água e contaminação da água por deterioração em massa, além de oclusão de filtros, bombas e sistemas de refrigeração de indústrias (DARRIGRAN & DRAGO, 2000). Barcos, indústrias e redes de captação de água são afetados, levando à prejuízos de perda de tempo e equipamentos. Estima-se em um milhão de reais o gasto anual com manutenção, reparos, troca de motores e pinturas especiais em barcos após o aparecimento do mexilhão. Em hidrelétricas, provoca a obstrução de filtros, trocadores de calor e turbinas, obrigando as usinas a pararem seu funcionamento para limpeza causando um prejuízo de milhões em energia não gerada (MANSUR, 2003a; 2003b; MANSUR *et al*, 2003). Em Porto Alegre, o Departamento Municipal de Águas e Esgoto (DMAE) retira o mexilhão-dourado dos encanamentos desde 1999 (BENDATI, 2003; COLARES, 2003).

O *L. fortunei* também pode provocar danos ecológicos. Pelo fato deste organismo ser filtrador ativo, acumula grande quantidade de pseudofezes que possibilitam o desenvolvimento de bactérias e fungos que podem prejudicar outros moluscos. A fixação de larvas do mexilhão dourado junto às aberturas das valvas de outros bivalves, pode provocar a morte destes por sufocamento, após o seu crescimento (DARRIGRAN & DRAGO, 2000; MANSUR *et al.*, 2003). Por esses motivos, no ambiente natural, *L. fortunei* altera a composição do bentos, favorecendo o aparecimento de certos invertebrados em detrimento de outros (DARRIGRAN & DRAGO, 2000).

II Objetivos

O bivalve exótico *Limnoperna fortunei* foi selecionado como organismo bioindicador devido a sua ótima adaptação à Região Hidrográfica do Lago Guaíba, ampla distribuição, disponibilidade durante todo o ano, grande tamanho populacional, facilidade de coletar e trabalhar. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram:

- a) Padronizar as metodologias do ensaio cometa e da análise da freqüência de micronúcleos para utilização destas técnicas em células da hemolinfa do mexilhão *Limnoperna fortunei*.
- b) Evidenciar a potencialidade da utilização do *L. fortunei* como organismo biomonitor da genotoxicidade ambiental na região hidrográfica do lago Guaíba.
- c) Monitorar, em diferentes estações do ano, a atividade genotóxica na região hidrográfica do lago Guaíba utilizando *L. fortunei*.
- d) Detectar a presença de elementos inorgânicos (metais) no corpo mole de *L. fortunei*, em diferentes estações do ano na região hidrográfica do lago Guaíba, utilizando o método de PIXE.
- e) Monitorar, em diferentes estações do ano, a atividade mutagênica de amostras de água superficial e água intersistrial de sedimentos do lago Guaíba aplicando o ensaio *Salmonella/microssoma* com diferentes linhagens.
- f) Correlacionar os resultados da presença de elementos inorgânicos e a resposta mutagênica encontrados nas amostras de sedimento e espécie biomonitora.

g) Correlacionar as respostas mutagênicas e genotóxicas em água, sedimento e na espécie biononitora buscando entender a distribuição de contaminantes genotóxicos e seu efeito nos organismos que habitam o lago Guaíba.

**III Capítulo 1 - DNA Damage and Repair in
Haemolymph Cells of Golden Mussel (*Limnoperna
fortunei*) Exposed to Environmental Contaminants**

Mutat. Res. 697: 78 – 86, 2006.

**DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel
(*Limnoperna fortunei*) Exposed to Environmental Contaminants**

Izabel Vianna Villela ^a

Iuri Marques de Oliveira ^a

Juliana da Silva ^{a, b}

João Antonio Pêgas Henriques ^{a, b *}

^a GENOTOX/ Centro de Biotecnologia/ PPG em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, Prédio 43421, Campus do Vale, Caixa Postal 15005, CEP 91501970, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Genética Toxicológica - Curso de Biologia/ Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil.

* Corresponding author, Tel.: +55 51 33166069; fax: +55 51 33166084

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br

Abstract

The development of methodologies for biomonitoring freshwater ecosystems is of particular relevance in view of the serious problem of aquatic environmental pollution. The mussel species *Limnoperna fortunei* (golden mussel) was chosen to be tested as a biomonitor organism based on its population data and distribution. *L. fortunei* individuals were exposed to UV radiation *in vitro*, and *in vivo* to pentachlorophenol (PCP) and copper sulphate (CuSO_4), with the aim of standardizing comet assay and micronucleus test methodologies and evaluating the potential of this organism as a biomonitor. Haemolymph cells immobilized in agarose on slides exposed to UV radiation showed a dose response relationship with maximum damage at 4.2 J/m^2 . For the chemical tests, individuals were exposed for 2h for the comet assay and 24 and 48h for the micronucleus test. A dose-response relationship was observed for both chemicals. 3.10^{-5}M CuSO_4 induced high genotoxicity, also producing some toxicity after 48 h of exposure. PCP induced maximum damage in both assays at $150 \mu\text{g/L}$. Individuals exposed to PCP showed 100% repair 2h after the exposure period, as assessed by the comet assay. Exposure to an environmental sample over seven days confirmed the mussel sensitivity to water contaminants, detected both by the comet assay and the micronucleus test. The results allow us to suggest the golden mussel as a potential biomonitor organism.

Key words: *Limnoperna fortunei*, water genotoxicity, comet assay, micronucleus test.

1. Introduction

Water pollution directly influences aquatic life, and may affect non-aquatic organisms participating in the food chain simply due to drinking contaminated water [1]. Changes in the cell genome, caused by genotoxic agents leading to mutations and possibly tumor formation, are some of the lethal or sub-lethal effects induced by a complex mixture of pollutants. Agents that damage DNA are difficult to detect in epidemiological studies because their effects take a long time to appear. Therefore, they must be effectively and continuously monitored [2].

Biomonitoring organisms have long been used as a means of warning people as to unsafe environments. The observation of poisoned animals is considered the first indication of the harmful potential of any environment to human health. In order to act as an indicator of genotoxic damage, an organism must be able to detect different types of damage in different cell types, besides being sensitive and easily accessible to the pollutants [3, 4].

In water bodies, it is very useful to employ bivalve molluscs, since they are filter feeders, are motionless, and have the capacity to accumulate contaminants [5]. Exotic fresh water bivalves have been widely used for this purpose [5, 6, 7, 8]. The exotic organism *Limnoperna fortunei* (golden mussel) has expanded greatly since its introduction in the south of Latin America in 1991, according to [9], and in the Guaíba lake (located in the most southerly state of Brazil) in 1998 [10]. Its excellent adaptation, wide distribution and availability at different times of the year, together with easy collection, make it a good candidate for a sentinel organism.

The comet assay (or Single Cell Gel Electrophoresis Assay, SCGA), which detects primary damage to DNA, such as single and double strand breaks, alkali-labile lesions, oxidative damage and crosslinks, has been widely applied as the first endpoint to evaluate genotoxicity in eukaryotic cells [8, 11]. SCGA can be performed on any eukaryotic cells, which do not necessarily have to be dividing

[12, 13]. Another widely recommended test for eukaryotic cells is the micronucleus test (MN) that indirectly evaluates both chromosomal breaks and mitosis dysfunctions, showing clastogenic and aneugenic damage. In this case, the cells must have undergone cell division [14]. Both assays are widely used in molluscs to biomonitor aquatic environments [5, 6, 7, 8]. Haemolymph is suggested to be the most appropriate tissue for biomonitoring, because its physiological role in the transport of toxic materials and in several defense mechanisms [15] means that it is directly exposed to environmental contaminants.

The present study aims to standardize SCGA and MN test methodologies for the golden mussel, and evaluating its potential as a biomonitor organism for the detection of genotoxicity in polluted water. Ultraviolet radiation (254 nm, UVC), pentachlorophenol (PCP-biocide used to preserve wood) and copper sulfate (CuSO_4 widely used as a pesticide) were used as test agents. The induction of a genotoxic response by a contaminated environmental sample using the golden mussel was also tested. Pentachlorophenol, as well as copper sulfate, is a potential water contaminant controlled by the Brazilian law. Resolution 20 (1986) of the National Council for the Environment (CONAMA) [16] defines the classification, the use, and the quality parameters of chemical substances, including potentially dangerous ones, in national waters.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents

Copper sulfate (cas # 7758998) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), and pentachlorophenol (cas # 87865) from Fluka (Buchs, Switzerland). Low melting point (LMP) and normal agarose (electrophoresis grade) were obtained from Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Animals

L. fortunei individuals were collected in the Itapuã State Park preservation area (RS, Brazil), which is an uncontaminated area protected by the environmental department of the state government [17]. Approximately 200 individuals were collected, and immediately transported to the laboratory. About 100 animals were placed in each of two aquaria containing 2 L of water from the collection site, and kept under constant aeration at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Animals were fed every two days with feed for herbivorous fish, prepared by previously blending it with water. Experiments started after an adaptation period from 7 to 20 days – this period was determined per experiment. All genotoxic assays were performed using the hemolymph cells of the mussels. The hemolymph was collected in the posterior adductor muscle with a hypodermic needle while the mussels were still alive, and the animals euthanized immediately after collection, 16 individuals were analyzed in pools of 4 to enhance cell concentration in order to simplify the visual scoring for each exposure dose and control group of each assay. Animals were not fed during exposure.

2.3. Exposure to mutagenic agents

Ultraviolet radiation (*in vitro*): haemocytes of *L. fortunei* individuals, not exposed to chemical agents, were collected, and slides were prepared for comet assay (as described in item 2.6). Before being placed in lysis solution, slides were exposed to UV radiation (254 nm) at 0.7, 2.5, 3.3, 4.5 and 5.0 J/m². The source of light and dosimetry are described in [18].

Chemical agents (*in vivo*): adult bivalves (1 to 2 cm long) were divided into groups of 2 individuals in small plastic containers with 70 mL of water from Itapuã state park. After 24 h, the water was exchanged for an exposure solution in which the animals were left for 2 h for the SCGA (detection of recent damage), and for 24 and 48 h for the MN test (which requires the cell division period). When 48 h exposure was required, the solution was changed after 24 h. The golden mussels

were exposed to different concentrations of PCP (10, 80, 100 and 150 µg/L, as described in [5, 6]) and CuSO₄ (1.88, 3.75, and 7.50 µg/mL for MN, and 3.75, 7.50, 15.00 and 20.00 µg/mL for SCGA, as used by Guecheva *et al.*,[19]). Both solutions were prepared in the water collected at Itapuã. Molluscs kept in water from Itapuã were used as controls. The maximum concentration allowed by Brazilian law [16] for pentachlorophenol is 10 µg/ml, which is above the one used in this study (150 µg/L, or 0.15 µg/ml). For copper sulfate, the maximum concentration allowed is 20 µg/ml [16], which was equal to the highest dose used in this study.

2.4. Exposure to environmental samples

About 80 individuals were kept for 7 days in aquaria containing 2 ± 0.1 L of water sample plus 100 ± 5 g of sediment sample. Every 24 h, $\frac{1}{4}$ of the total volume of water and sediment was changed. Water and sediment samples were collected in September 2003 and March 2004 from an area of the mouth of Dilúvio stream. This stream crosses the city of Porto Alegre (RS, Brazil) and receives sewage outflows and a large part of the storm drainage of the city. There is also contamination from the intense car traffic. Molluscs kept in water and sediment from Itapuã were used as controls.

2.5. DNA repair analysis

Molluscs capacity to repair DNA damage was evaluated after the exposure of individuals to 100 µg/L of PCP for 2 h under the same conditions as previously described. Thereafter, the mussels were removed from the solution and placed in clean water (Itapuã). Groups of 16 animals was sacrificed and slides were prepared after 0, 2, 4, and 24 h of exposure.

2.6. Comet Assay

The SCGA was performed according to published methods [5, 12, 13] and adapted to the characteristics of *L. fortunei* in order to obtain maximum sensitivity with the least damage to the control group. Briefly, 10 μ l of haemolymph from the pool of 4 animals were centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and then were added to 90 μ l of LMP agarose 0.75% (w/v), mixed, and placed on a microscope slide pre-coated with normal melting point agarose 1.5% (w/v). A coverslip was added, and the slides immediately placed on ice. After agarose solidified, coverslips were removed, and the 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. The slides were kept frozen in lysis solution (4°C), and protected from the light for at least 1h and at most 3h. They were subsequently incubated in freshly-prepared alkaline buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH 12.1, which was experimentally determined) for 10 min for DNA unwinding. Electrophoresis (15 minutes at 270 mA and 21V (0.8 V/cm)) was performed in the same buffer. Every step was carried out under indirect yellow light. After electrophoresis, the 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, glycerol 5% v/v, rinsed three times in distilled water, and dried for 2 h at 37°C. The 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, silver nitrate 0.1% w/v, tungstosilicic acid 0.25%, formaldehyde 0.15% w/v, freshly prepared in the dark), and constantly shaken for 35 minutes. The stained slides were rinsed twice with distilled water, and submerged in the stop solution (acetic acid 1%), rised again, and immediately coded for analysis. Each replicate consisted of a pool of 4 individuals, and 4 replicates were prepared per concentration.

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 with a micrometric eyepiece (1 unit~5 μ m at a 400X magnification), in

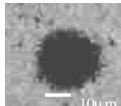
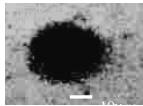
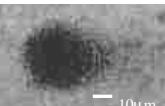
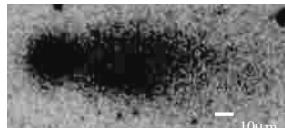
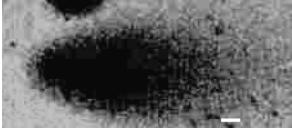
order to estimate approximate comet length (head + tail) in μm . For damage index calculation, cells were divided into four classes, according to tail size (Figure 1a). The damage index (DI) is the sum of classes of the 100 cells analyzed, and may vary from 0 (all cells undamaged – 0 X 100) to 400 (all cells damaged – 4 X 100). The 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. The damage frequency (DF) was calculated as the percentage of cells with a tail.

International guidelines and recommendations for SCGA consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method, and that it can be used with high reliability [20, 21]. This was also shown by Garcia *et al.* [22], who compared the comet assay carried out in different laboratories with silver staining and visual scoring, and showed high correlation between the results.

2.7. The micronucleus test

The MN test was adapted to the characteristics of the test organism based on protocols described for other mussels [23, 6]. Haemolymph was collected in a syringe with had been washed with EDTA (10mM), and fixed with an equal volume of sodium citrate (1%) for 5 min and with 40% of formalin (4%) for 10 min. After fixation, haemolymph was centrifuged for 8 min at 1000 rpm, the supernatant was removed, leaving a sufficient quantity to re-suspend the cells. These were gently placed on the slide to prevent membrane damage. After overnight drying at room temperature, slides were stained for 7 min in a solution of Giemsa at 3%. One thousand cells with complete cytoplasm were analyzed in each slide, and the presence or absence of MN was recorded (Figure 1b). Each slide was produced from a pool of 4 individuals, and 4 slides were prepared per concentration.

a

Observed DNA damage	Head / Tail	Damage classes
 10µm	No tail	0
 10µm	≤ 1	1
 10µm	1 – 2	2
 10µm	≥ 2	3
 10µm	No head	4

b

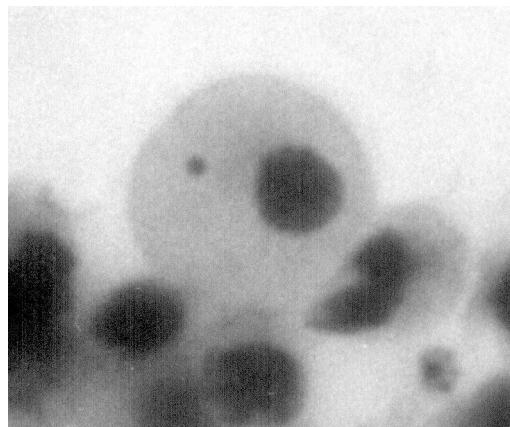


Fig. 1: a) Different classes of cell damage as detected by the comet assay in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei*; b) Haemolymph cell of *Limnoperna fortunei* showing a micronucleus.

MN were identified according to the following criteria: spherical cytoplasmic inclusions with a defined contour, diameter smaller than approximately 1/3 of the main nucleus, color and texture similar to the nucleus, and absence of contact with the nucleus.

2.8. Statistics

Results were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test for comparison of treatments.

3. Results

The repetition of the comet assay on different days after collecting the mussels allowed us to determine the period required for adaptation, which was between 7 - 20 days, because it was observed that after 6 days basal DNA damage index (DI) decreases, and remains below 46 until 20 days (Table 1). In order to determine the best pH for SCGA electrophoresis, three standard pH values, 8, 12.1, and >13, were tested. Basal damage was detected at pH 8 and 12.1, with a significant increase at pH >13 (Table 2). These results show that pH 8 and 12.1 present the same basal DNA damage. However, the use of slightly alkaline pH (12.1) allowed the detection of a larger number of lesions, such as single strand breaks and excision repair sites, which were not detected at neutral pH. Therefore, pH 12.1 was chosen for this study.

The response of haemolymph cells to different UV radiation doses (254 nm) *in vitro* can be seen in Figure 2. At 0.7 J/m², there was significant induction of damage (DI and DF), which increased up to 4.5 J/m².

Table 1: Detection of DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* at different periods after mussel sampling.

Days after sampling	DI^a
0	214.67± 42.45
1	108.33± 58.45
2	108.33± 58.45
3	95.00± 16.52
4	103.00± 35.34
6	46.33± 19.50
8	40.00± 13.89
10	26.00± 5.57
14	32.33± 7.02
20	39.33± 10.69

^a Damage Index (DI) - 0= no damage; 400= maximum damage, expressed as mean ± S.D; values obtained from an average of 100 cells per pool. In each group: n= 16 / 4 animals per pool, 4 pools per group.

Table 2: Detection of basal DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* using different pH values during electrophoresis.

pH	DI^a
8	25.67 ± 6.43
12.1	24.00±6.08
13	246.33±138.82

^a Damage Index (DI) - 0= no damage; 400= maximum damage, expressed as mean ± S.D; values obtained from an average of 100 cells per pool. In each group: n= 16 / 4 animals per pool, 4 pools per group.

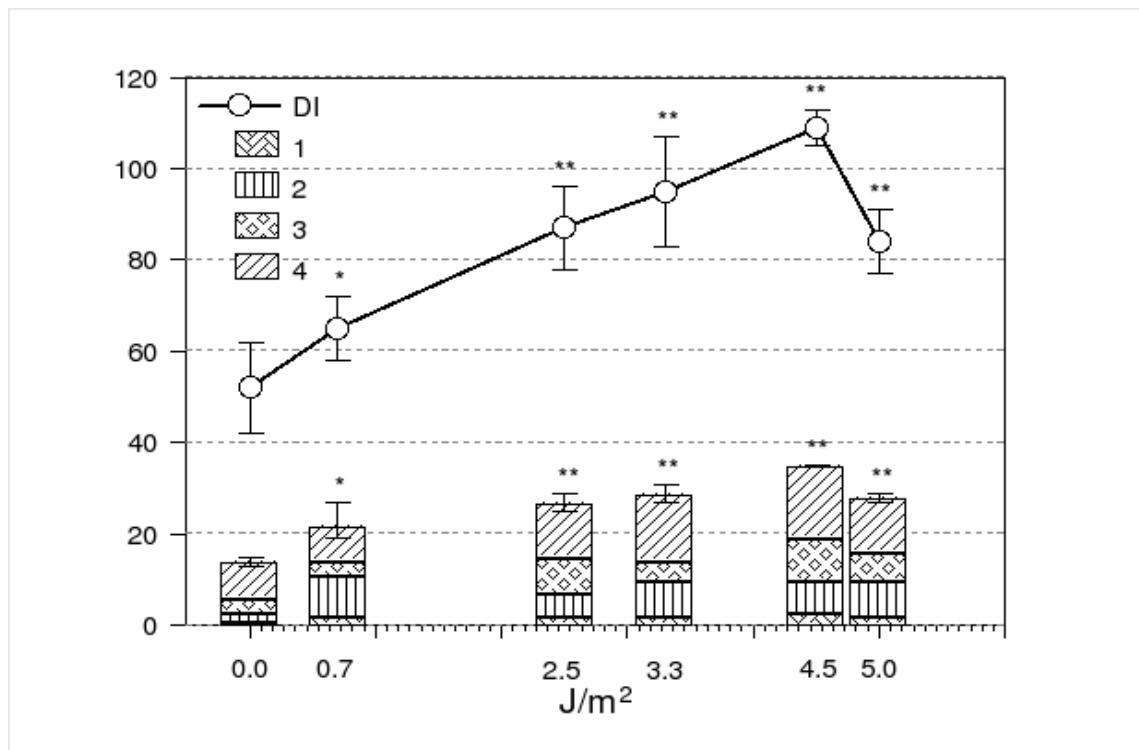


Fig. 2: Detection of DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* exposed *in vitro* to UVC for different periods. Damage Index (DI) - 0= no damage; 400= maximum damage, and Damage Frequency (bars) - 0% = no damage; 100% = maximum damage, expressed as mean \pm S.D values obtained from an average of 100 cells per pool. Mean of each damage class (1, 2, 3, 4) frequency are represented by different patterns. In each group: n= 16 / 4 animals per pool, 4 pools per group.

Significant at * P< 0.05, ** P< 0.01; in all cases significance was tested with respect to 0 (control) using ANOVA and Dunnet's test.

Table 3 shows the results obtained by the exposure of bivalves to CuSO₄, indicating a significant increase in the DI to DNA at the concentrations of 7.50, 15.00, and 20.00 µg/mL, as compared to the control group. DF analysis confirmed this result: 3.75 µg/mL also caused a significant increase in the percentage of damaged cells. The IL result did not show any differences among CuSO₄ levels. PCP (100 and 150 µg/L) significantly increased DNA damage (Table 3). DI and DF increased at 100 and 150 µg/L. Once again, IL was not changed.

Table 3: Detection of DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* exposed *in vivo* to copper sulphate (CuSO_4) and pentachlorophenol (PCP) at different doses.

Agent/ dose		Comet assay	
CuSO_4 ($\mu\text{g/ml}$)	Image Length (μm) ^a	Damage Index ^a	Damage Frequency (%) ^a
0 (Water)	30.5 ± 3.3 ^b	40.0 ± 15.7 ^b	11.7 ± 5.0 ^b
3.75	31.7 ± 1.5	60.3 ± 12.7	$25.3 \pm 3.6^{**}$
7.50	32.4 ± 2.3	$66.4 \pm 11.9^*$	$21.5 \pm 3.8^{**}$
15.00	34.6 ± 1.4	$79.8 \pm 8.8^{**}$	$23.5 \pm 2.5^{**}$
20.00	36.4 ± 5.0	$79.2 \pm 25.6^{**}$	$22.0 \pm 7.6^{**}$
PCP ($\mu\text{g/l}$)			
0 (DMSO 5%)	31.8 ± 5.7	39.7 ± 17.5	15.75 ± 6.2
10	36.9 ± 1.4	60.3 ± 14.9	22.0 ± 4.0
80	36.5 ± 6.8	92.5 ± 22.4	37.0 ± 15.0
100	44.6 ± 1.3	$134.4 \pm 11.0^{**}$	$55.0 \pm 11.0^{**}$
150	45.5 ± 3.2	$147.3 \pm 56.3^{**}$	$51.7 \pm 13.0^{**}$

^a Image Length, expressed in μm , Damage Index - 0= no damage; 400= maximum damage, and Damage Frequency - 0%= no damage; 100%= maximum damage, expressed as ^b mean \pm S.D values obtained from an average of 100 cells per pool. In each group: n=16 / 4 animals per pool, 4 pools per group.

Significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, in all cases significance was tested with respect to 0 (control) using ANOVA and Dunnet's test.

The frequency of MN in cells treated for 24h with CuSO_4 (3.75 and 7.50 $\mu\text{g/mL}$, as compared to control values of approximately 5 MN in 1000 cells) significantly increased. The results after 48 h of exposure show that sensitivity was maintained over time; however, it decreased at 7.50 $\mu\text{g/mL}$ (Table 4). MN frequency data obtained after PCP exposure indicate a significant increase in the number of MN, as compared to the control group, at all concentrations and at both exposure times (Table 4).

SCGA was performed 0, 2, 4, and 24 h after exposure to 100 $\mu\text{g/L}$ of PCP for 2h in order to evaluate the DNA repair capacity of the golden mussel. The control group consisted of individuals kept in clean water; 0 h indicates the end of the 2 h of PCP exposure, when damage is maximal, and 2, 4 and 24 h are the post-exposure times. After 2 h in clean water, the mussel was able to repair the DNA damage caused by PCP (Fig.3).

Table 4: Detection of micronucleus frequency in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* exposed *in vivo* to copper sulphate (CuSO_4) and pentachlorophenol (PCP) at different doses and different exposure times.

Agent/ dose	Micronucleus test	
	24h ^a	48h
CuSO_4 ($\mu\text{g/ml}$)		
0 (water)	4.7 \pm 1.2 ^b	5.7 \pm 0.6
1.88	8.7 \pm 1.2	5.0 \pm 0.0
3.75	18.7 \pm 0.6**	17.0 \pm 5.1**
7.50	18.0 \pm 3.5**	12.0 \pm 1.7
PCP ($\mu\text{g/l}$)		
0 (DMSO 5%)	6.0 \pm 0.0	6.3 \pm 0.6
10	9.0 \pm 0.0**	12.3 \pm 0.6**
80	13.3 \pm 0.5**	15.6 \pm 0.6**
100	15.0 \pm 1.0**	16.3 \pm 1.2**
150	17.3 \pm 0.6**	18.0 \pm 1.0**

^a Time of exposure ^b Number of micronuclei are mean \pm S.D value obtained from an average of 1000 cells per pool. In each group: n=16 / 4 animals per pool, 4 pools per group.

Significant at * P< 0.05, ** P< 0.01; in all cases significance was tested with respect to 0 (control) using ANOVA and Dunnet's test.

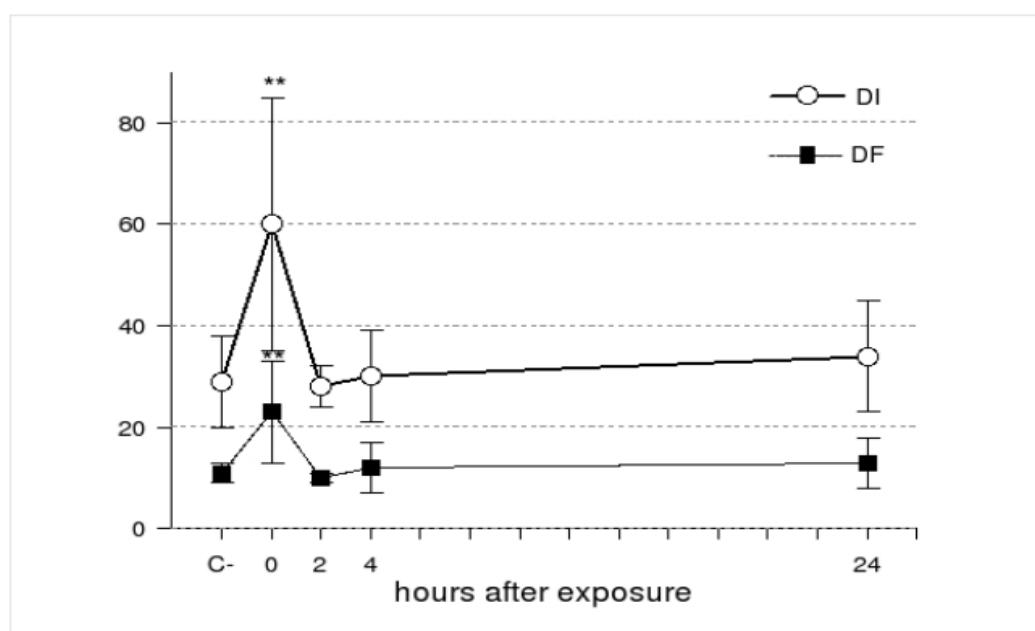


Fig. 3: Repair of DNA damage in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* exposed *in vivo* to Pentachlorophenol. Damage Index (DI) - 0= no damage; 400= maximum damage, and Damage Frequency (DF) - 0%= no damage; 100%= maximum damage, are expressed by mean \pm S.D values obtained from an average of 100 cells per pool. In each group: n= 16 / 4 animals per pool, 4 pools per group.

Significant at * P< 0.05, ** P< 0.01, in all cases significance was tested with respect to 0 (control) using ANOVA Dunnet's.

The mussels were also exposed to the water and sediment samples collected in September 2003 at the area of the mouth of Dilúvio Stream. The results of the SCGA were compared to a recently published study [24], in which this stream was monitored using a planaria (*Giardia schubarti*) as a biomonitoring organism (Table 5). The golden mussel also indicated the presence of contaminants with genotoxic potential in this body of water. MN induction under the same conditions was also observed in samples collected in March 2004.

Table 5: DNA damage by the comet assay and micronuclei frequency in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* compared with *Girardia schubarti* exposed *in vivo* to environmental sample.

Comet assay	Sample (sampling month)	Damage Index ^a	Damage Frequency ^a
<i>G. schubarti</i> ^c	Control water (01/2001)	11.3 ± 3.9 ^b	15.3 ± 6.6 ^b
	Dilúvio mouth 01/2001)	39.0 ± 6.5*	34.7 ± 7.1*
<i>L. fortunei</i>	Control water (09/2003)	28.0 ± 11.6	11.0 ± 2.8
	Diluvio mouth (09/2003)	66.7 ± 12.6**	22.7 ± 3.5**
Micronuclei assay	Sample (sampling month)	Micronuclei ^d	
<i>L. fortunei</i>	Control water (03/2004)	3.5 ± 0.6	
	Diluvio mouth (03/2004)	7.3 ± 0.9*	

^a Damage Index - 0= no damage; 400= maximum damage, and Damage Frequency - 0%= no damage; 100%= maximum damage, are expressed by ^b mean ± S.D values obtained from an average of 100 cells per pool. In each group: n=16 / 4 animals per pool, 4 pools per group. ^c PRÁ *et al.* (2005). ^d Number of micronuclei are mean ± S.D value obtained from an average of 1000 cells per pool. In each group: n=16 / 4 animals per pool, 4 pools per group.

Significant at ** P< 0.01, in all cases significance was tested with respect to control water, for *L. fortunei* using ANOVA Dunnet's.

4. Discussion

The increase in the discharge of chemical contaminants into the aquatic environment has led to an increased urgency for the development of sensitive and reliable methods to assess the impact of these toxic agents on organisms inhabiting lakes, rivers, and seas [7, 25]. The consequences of exposure and the metabolism of chemicals may also be evaluated by investigating biological endpoints, i.e., adducts and DNA strand breaks [25]. This study demonstrated the sensitivity of the golden mussel as an environmental biomonitor, and standardized the methodologies of the MN test and the SCGA for this organism.

The purpose of exposure to UV radiation at 254 nm was to evaluate the sensitivity of *L. fortunei* haemolymph cells to the induction of genotoxic damage detectable by the SCGA, also seeking to adapt a positive control without using mutagenic chemicals. Our results show that haemolymph cells are as sensitive to this damage as *Mytilus edulis* gills cells, which were tested under the same conditions by Ranks and Jensen [26]. In both studies, mussels from the Mytilidae family showed dose-dependant damage, with a small reduction at the highest dose. This reduction may be due to the formation at high doses of UVC radiation of DNA crosslinks, which immobilize DNA fragments migration and prevent the formation of comets [26]. However, it is known that 20-min treatment at alkaline pH unties crosslinks; in the present study, alkaline bath before electrophoresis was sufficient to promote this [20]. An alternative explanation for the lower damage index found in this study is the higher number of necrotic or apoptotic cells, which were not evaluated by the SCGA. The progression of highly damaged cells to apoptotic or necrotic stages reduces the damage index, masking the real extent of damage. Our results, as earlier reported by Ranks and Jensen [26], lead us to suggest a 4.5 J/m² UVC exposure dose as another option for positive control, especially in biomonitoring studies. *L. fortunei*, the bivalve species targeted for analysis in the present study, also proved to be sensitive to the genotoxic chemicals tested *in vivo*.

The results of the SCGA and MN test (24 h exposure) demonstrated a dose-related increase in DNA damage for CuSO₄. The significant increase in DNA damage observed in golden mussel haemocytes by the SCGA at the same concentrations that induced a significant increase in MN frequency (3.75 and 7.50 µg/mL), indicates that the damage caused by copper is equally detected by both tests. These results imply that CuSO₄ is responsible for clastogenic damage. Guecheva et al. [19], using the SCGA, found similar genotoxic effects of CuSO₄ in planarian individuals exposed for two hours to 2, 4, and 5.10⁻⁵M (approximately 4 to 15 µg/mL). Bolognesi et al. [23], using the alkaline elution method, and analyzing the frequency of MN in mussel gills (*Mytilus galloprovincialis*), also recorded an increase in the number of DNA strand breaks induced by copper

chloride at 40 μ g/L. Iron and copper can act via the redox cycle to produce reactive oxygen species (ROS), which may cause DNA strand breaks [27].

In 48 h exposure experiments, MN frequency decreased at the highest concentration (7.50 μ g/mL), probably because this dose presents a certain level of toxicity. As in most non-mammalian systems that use the micronucleus test without cell division markers (such as cytochalasin B), this system is subject to variation due to toxicity and disturbances in the cell cycle caused by temperature as well. Bolognesi *et al.* [23] also observed toxicity in their study using 5 days of exposure, in which 80 μ g/L was considered toxic for haemolymph cells. SCGA was possible at higher doses than those used for the MN assay, apparently due to the lower exposure period (2 h). In the MN test, 24 h and 48 h exposure to CuSO₄ doses higher than 7.50 μ g/mL were toxic, killing all exposed animals (data not show).

Another environmental contaminant (PCP) was used to assess the sensitivity of the golden mussel and the standardization of the methodologies. A dose-dependent behaviour was observed in the SCGA and the MN test. After 7 days exposure to 80, 100, and 150 μ g/L PCP, a significant induction of damage of haemolymph cells of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* was detectable both by the SCGA [5], and by the MN test [6]. *L. fortunei* is also sensitive to this environmental contaminant, although at different intensities due to differences in exposure times and in species and populations. Therefore, this organism is also an adequate biomonitor for environmental pollution.

PCP increases oxygen consumption in exposed animals. This is caused by reduced control of the mitochondrial respiratory chain, due to oxidative phosphorylation uncoupling [28, 29]. High oxygen consumption may cause higher ROS production [30], which could explain the PCP toxicity mechanism. Oxidative DNA damage generated by ROS, such as those that inevitably appear during respiration, has been attributed to increased damage of gill cells DNA of *Mytilus edulis* [31].

The main lesions caused by oxidative stress are simple breaks, the change of apurinic bases and sites. These lesions are predominantly repaired by base excision (BER). Thus, when the repair of damage caused by pentachlorophenol is observed (Figure 3), one can infer active BER in *Limnoperna fortunei* mussel. This is one of the first reports of DNA repair activity in this organism.

A similar response is seen when comparing the golden mussel with planaria as biomonitoring organisms. Although *L. fortunei* baseline (water control) damage index and frequency are higher than that observed for planaria [24], both organisms more than doubled this value when exposed to samples of Dilúvio stream water and sediment. The induction of MN in molluscs exposed to these environmental samples confirms not only the presence of genotoxicity, but also of mutagenicity. This result confirms the genotoxic and mutagenic potential of Dilúvio stream contaminants, and emphasizes the efficiency of the golden mussel as an organism to biomonitor genotoxicity.

The SCGA and MN test results obtained after exposure of haemolymph cells *in vitro* to UVC and the mussel *in vivo* to CuSO₄, PCP, and to an environmental sample, demonstrate the sensitivity of the golden mussel to these environmental genotoxins. The conditions of the study are limited, but it still allows us to suggest that this mollusc can be used as a biomonitoring organism for the evaluation of genotoxicity in aquatic environments. These exotic mussels are present in contaminated sites, in large populations with no sampling restrictions. The sensitivity and applicability of the micronucleus and comet assay tests for the evaluation of genotoxicity was confirmed, as well as the genotoxic potential of these chemical agents, as already described in the literature.

Acknowledgements

The authors would like to thank Thales de Freitas for providing the laboratory facilities, Daniel Prá for his assistance during the field work, and Dr. Cristine Gaylar and Dr. Martin Brendel for revising this manuscript. We would also like to

thank the Conservation Unit Division (Divisão de Unidades de Conservação) of the environment department of the state government for allowing us to collect samples in Itapuã State Park (RS, Brazil) and COPESUL, GENOTOX-UFRGS, CAPES, and CNPq for the financial support.

References

- [1] L. Gauthier, E. Tardy, F. Mouchet, J. Marty, Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*, *Sci. Tot. Environ.*, 323 (2004) 47-61.
- [2] R.R. Arnaiz, Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos, La Ciência para Todos, Fondo de Cultura Económica, Segunda ed. México, 1997.
- [3] S.L. Loeb, A. Spacie, Biological Monitoring for Aquatic Systems, Lewis Publishers, Boca Raton, 1994.
- [4] J. Silva, V. Heuser, V. Andrade, Biomonitoramento Ambiental, in: J. Silva, B. Erdtmann, J.A.P. Henriques (orgs.), Genética Toxicológica., Alcance, Porto Alegre, 2003.
- [5] M. Pavlica, G.I.V.M. Klobucar, N. Mojas, R. Erben, D. Papes, Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay, *Mutat. Res.* 490 (2001) 209 – 214.
- [6] M. Pavlica, G.I.V.M. Klobucar, N. Vetma, R. Erben, D. Papes, Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol, *Mutat. Res.* 465 (2000) 145 – 150.
- [7] G.I.V.M. Klobucar, M. Pavlica, R. Erben, D. Papes, Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquat. Toxicol.* 64 (2003) 15-23.
- [8] C. Bolognesi, A. Buschini, E. Branchi, P. Carboni, M. Furlini, A. Martino, M. Monteverde, P. Poli, C. Rossi, Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants, *Sci. Tot. Environ.* 333 (1-3) (2004) 127 - 36.
- [9] G. Pastorino, G. Darrigran, S. Martin, L. Lunaschi, *Limnoperna fortunei*

(Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del río de La Plata, Neotropical. 39 (1993) 101-102.

[10] M.C.D Mansur, C.B. Quevedo, C.P. Santos, C.T. CALLIL, Prováveis vias de introdução de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Molusca, Bivalvia, Mytilidae) na Bacia da Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul e novos registros de invasão no Brasil, pelas Bacias do Alto Paraná e Paraguai, in: J.S.V. da Silva, R.C.C.L. de Souza, Água de Lastro e Invasão, 33-38, 2004.

[11] N.P. Singh, Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis, Mutat. Res. 455 (2000) 111 – 127.

[12] C.L. Mitchelmore, J.K. Chipman, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in the environmental monitoring, Mutat. Res. 399 (1998) 135 – 147.

[13] R.F. Lee, S. Steinert, Use of the Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay for Detecting DNA Damage in Aquatic (marine and freshwater) animals, Mutat. Res. 544 (2003) 43-64.

[14] M. Hayashi, J.T. Mac Gregor, D.C. Gatehouse, I.D. Adler, D.H Blakey, S.D. Dertinger, A. Krishn, T. Marita, A. Russo, S. Sutou, In vitro rodent erythrocytes micronucleus assay: II Some aspects of protocol design including repeated treatments integration with toxicity testing, and automated scoring, Environ. Mol. Mutagen. 35 (2000) 234 – 252.

[15] J. Mersch, M.N. Beauvais, P. Nagel, Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens, Mutat. Res. 371 (1996) 47-55.

[16] BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente, resolução n. 20, de 18 de junho de 1986. Classifica as águas do Território Nacional. *Diário Oficial da república Federativa do Brasil*, Brasília, 30 de junho de 1986. <http://www.mma.gov.br/pot/conama/res/res86/res2086.html>

[17] Governo do Estado do Rio Grande do Sul, web page Secretaria Estadual do Meio Ambiente <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/bioconh5.html>.

[18] J.A.P. Henriques, E. Moustachi, Isolation and characterization of PSO mutants sensitive to photoaddition of psoralen derivates in *S. cerevisiae*. Genetics 95 (1980b) 273 - 288.

[19] T. Guecheva, J.A.P.H. Henriques, B. Erdmann, Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied by the single-cell gel test (comet assay), Mutat. Res. 497 (2001) 19-27.

- [20] R.R. Tice, E. Agurell, D. Aderson, G. Burlinson, A. Hartman, H. Hobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J-C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen. 35 (2000) 206-221.
- [21] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendation for conducting the in vivo alkaline comet assay, in: Proceedings of the Fourth International Comet Assay Workshop, Mutagenesis 18 (2003) 45- 51.
- [22] O. Garcia, T. Mandina, A.I. Lamadrid, A. Dias, A. Remigio, Y. Gonzalez, J. Piloto, J. Gonzales, A. Alvarez, Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay results of inter-labotatory scoring exercise with the use of silver staining, Mutat. Res. 566 1-2 (2004) 25-34.
- [23] C. Bolognesi, E. Landini, P. Roggieri, R. Fabbri, A. Viarengo, Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies, Environ. Mol. Mutagen. 33 (1999) 287-292.
- [24] D. Prá, A. H. Lau, T. Knakievicz, F. R. Carneiro, B. Erdtmann, Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarian, Mutat. Res. 585 (1-2), (2005), 79 - 85.
- [25] C.L. Mitchelmore, C. Birmelin, D.R Livingstone, J.K. Chipman, Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the “comet” assay, Ecotoxicol. Environ. 41 (1998) 51-58.
- [26] J. Rank, K. Jensen, Comet assay on gill and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*, Mutat. Res. 54 (2003) 323-329.
- [27] K.H. Cheeseman, T.E. Slater, An introduction to free radical biochemistry, Br. Med. Bull. 49 (1993) 491-493.
- [28] H. Holmberg, S. Jensen, A. Larsson, K. Lewander, M. Olsson, Metabolic effects of technical pentachlorophenol (PCP) on cell *Anguilla anguilla*, Comp. Biochem. Physiol. 43 (1972) 171-183. Apud: M. Pavlica, G.I.V.M. Klobucar, N. Mojas, R. Erben, D. Papes, Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay, Mutat. Res. 490 (2001) 209 – 214.
- [29] E.C. Weinbach, The effect of pentachlorophenol on oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 219 (1954) 545-564. Apud: M. Pavlica, G.I.V.M. Klobucar, N. Mojas, R. Erben, D. Papes, Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay, Mutat. Res. 490 (2001) 209 – 214.
- [30] L.E. Roszell, R.S. Andersson, Effect of in vivo pentachlorophenol exposure

on *Fundulus heteroclitus* phagocytes – modulation of bactericidal activity, Dis. Aquat. Org. 26 (3) (1996) 205-211. Apud: M. Pavlica, G.I.V.M. Klobucar, N. Mojas, R. Erben, D. Papes, Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay, Mutat. Res. 490 (2001) 209 – 214.

[31] J.T. Wilson, P.L Pascoe, J.M. Parry, D.R. Dixon, Evaluation of the comet assay as method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* (Molusca: Pelecypoda), Mutat. Res. 339 (1998) 197 – 210.

**IV Capítulo 2 - Assessment of environmental stress
by the micronucleus and comet assays on
Limnoperna fortunei exposed to Guaíba hydrographic
region samples (Brazil) under laboratory conditions.**

A ser submetido a Environment International

Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions

Izabel Vianna Villela ^a

Iuri Marques de Oliveira ^a

Juliano Coelho Silveira ^a

Johnny Ferraz Dias ^c

João Antonio Pêgas Henriques ^{a, b *}

Juliana da Silva ^{a, b}

^a GENOTOX/ Centro de Biotecnologia/ PPG em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421, Campus do Vale, Caixa Postal 15005, CEP 91501970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratório de Genética Toxicológica - Curso de Biologia/ Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil.

^c Laboratório de Implantação Iônica, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author, Tel.: +55 51 33166069; fax: +55 51 33166084

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br

Abstract

The Guaíba Basin is a source of drinking water for Porto Alegre (RS - Brazil). The water from this basin receives industrial, urban, and rural waste from many sources. The mussel species *Limnoperna fortunei* was chosen based on population data, distribution, and sensitivity. Previous tests with comet assay and micronuclei frequency in this freshwater mussel have shown to be successful in biomonitoring studies. The aim of this study was to evaluate the genotoxic contamination of the Guaíba Lake Hydrographic Region, through the determination of damage by the micronuclei and comet assays in *L. fortunei* (golden mussel). Nine sampling sites were evaluated in three different seasons: 5 sites in the mouths of the main rivers that flow into Guaíba lake; one site at the mouth of a stream; one major site of sewage discharge; two sites at Guaíba lake, near a sewage discharge; and the control site in a preservation area. DNA damage was detected by the single cell gel assay, as well as the frequency of micronuclei in hemocytes of mussels exposed under laboratory conditions for 7 days to water and sediment samples. Significant results were found in different seasons in almost all sampling sites ($P<0.05$ –Anova Dunnet's test). Most of the positive results were found in samples affected mainly by urban effluents. It was possible to observe that there was a weak relation between mutagenic and genotoxic responses and mussels inorganic elements contents. Seasonal variation was observed at different sampling sites, but always indicating a huge contamination near urban sewage discharge. These results are consistent with previous studies, allowing us to infer that urban contamination is the biggest problem in this region. It is also possible to infer that *L. fortunei* is a good sentinel organism for the Guaíba Basin.

Key words: *Limnoperna fortunei*, water genotoxicity, comet assay, micronucleus test, Guaíba basin.

1. Introduction

The current contamination of water resources as a consequence of anthropogenic discharges is becoming a major problem in ever growing urban regions. This change in water composition will obviously have deleterious effects on the organisms inhabiting these areas, in addition to human health (Ohe *et al.*, 2004). Among the lethal and sub lethal effects caused by these complex mixtures in water, there are fertility disorders, as well as cellular, metabolic, and DNA changes. These agents are not detected in epidemiological studies because a long time is needed to demonstrate and to identify their effects. These facts stress the importance of efficiently and continuously monitoring possible impacted areas using screening assays.

In water bodies, bivalve mollusks are very useful as biomonitoring, since they are filter feeders, and are motionless (Pavlica *et al.*, 2001), but their higher importance lies on their accumulation and transfer capacity. Lermiere *et al.* (2005) used the Single Cell Gel Assay (SCGA) to detect DNA damage in rats fed with mussels contaminated by an oil-spill. The results showed that the contaminants remained bioavailable in predators, and caused DNA damages. For this reason, monitoring of metals and organic contaminants using mussels is a technique used worldwide in this kind of study. A six year monitoring study to measure heavy metal and organic contaminants concentration in the soft bodies of *Perna viridis* attempted to establish spatial patterns of contaminants in Hong Kong Waters (Liu and Kueh, 2005). The authors determined that metal distribution was mainly related to local and regional sources, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) were related mostly to sewage discharge of urban centers.

Exotic freshwater bivalves are widely used in water biomonitoring studies (Pavlica *et al.*, 2000 and 2001; Klobucar *et al.*, 2003; and Bolognesi *et al.*, 2004). Mussels from polluted sites can develop adaptive mechanisms, making it difficult to interpret monitoring results. When using transplanted animals, responses

related to adaptation are reduced, and the results can be better compared because all individuals have a common genetic background (Klobucar *et al.*, 2003; Ralph and Petras, 1998).

Different tissues can be used for monitoring assays. The use of haemolymph cells is recommended, because they demand little manipulation, reducing the possibility of damage. The physiological role of these cells in toxicant transport and in various defenses mechanisms make them good candidates to be closely exposed to environmental agents (Mersch *et al.*, 1996). In the south of Latin America, the exotic organism *Limnoperna fortunei* (golden mussel) has greatly expanded since its introduction in 1991, according to Pastorino *et al.* (1993), particularly in the Guaíba lake (located at Rio Grande do Sul, the most southern state of Brazil) in 1998 (Mansur *et al.*, 2004). Its excellent adaptation, wide distribution, and availability at different times of the year, together with its easy collection, make it a good candidate as a sentinel organism. A previous study showed that *L. fortunei* is suitable for the detection of genotoxic environmental pollutants in the Guaíba lake basin, and also established the methodologies of the comet assay and micronucleous test with this organism (Villela *et al.*, 2006).

Guaíba lake hydrographic region consists of nine sub-basins (Guaíba, Gravataí, Sinos, Caí, Taquarí, Alto Jacuí, Baixo Jacuí, Vacacaí, and Pardo), all of them flowing to the Guaíba lake, that gives the name to the region. In this region, more than 8,000 industrial activities, intensive agriculture activities, and almost six million inhabitants are located. This region is responsible for 86% of the gross domestic production of Rio Grande do Sul state. This water is used for public and industrial water supply, irrigation, animal farms, primary contact recreation, fishing, and navigation. This places this region as the most social and economic relevant hydrographic basin in the state (Pró Guaíba, 2006).

Different genotoxic responses were found throughout the years in specific sites of this basin using the Ames test (Vargas *et al.*, 1988, 1993, 1995, and 2001; Lemos *et al.*, 1994), Sister Chromatid Exchange (Lemos *et al.*, 2000), Chromosomal Aberration (Guimmler-Luz *et al.*, 1992), Comet assay (Prá *et al.*,

2005), and the SMART test (Amaral *et al*, 2005a, b).

The main objectives of this study were to understand the genotoxic contamination contribution of the different rivers flowing into the Guaíba lake, and its relation with some contaminants. We analyzed samples from the main rivers that flow into Guaíba lake, and a brook that crosses Porto Alegre (1,2 million inhabitants) and two sites near this city sewage discharge by using the Micronucleus Test (MN) and Comet Assay (Single Cell Gel Assay - SCGA) in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* individuals sampled in a control site and exposed to laboratory conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Sample collection

Collection sites were (Figure 1): a) Itapuã ($30^{\circ} 38' S$, $51^{\circ} 05' W$), the control site, where mussels were collected; b) five sites at the mouths of the main rives that flow into Guaíba lake: Gravataí ($29^{\circ} 97' S$, $51^{\circ} 19' W$), Sinos ($29^{\circ} 88' S$, $51^{\circ} 24' W$), Caí ($29^{\circ} 89' S$, $51^{\circ} 82' W$), Jacuí ($42^{\circ} 90' S$, $66^{\circ} 85' W$) and Taquarí ($42^{\circ} 91' S$, $66^{\circ} 88' W$); c) Dilúvio ($30^{\circ} 05' S$, $51^{\circ} 20' W$) brook mouth, main site of sewage discharge; d) two sites at the Guaíba lake near sewage discharges: GuaíbaPC ($30^{\circ} 03' S$, $51^{\circ} 24' W$) and GuaíbaBR ($30^{\circ} 05' S$, $51^{\circ} 25' W$). Each sub-basin (named by it major river) evaluated in this study has a different antropogenic influence, as especified in Table 1. Is important to note that, in most cases, only the mouth of the rivers were analised, and not all the basin.

Superficial water samples were collected about 20 cm below the surface, and superficial sediment samples were collected with the aid of a manual grab sampler. All samples were kept on ice until laboratory manipulation and experiments.

This study was performed using different sampling periods: Winter (September 2003), Spring (December 2003), and Summer (March 2004 and 2005).

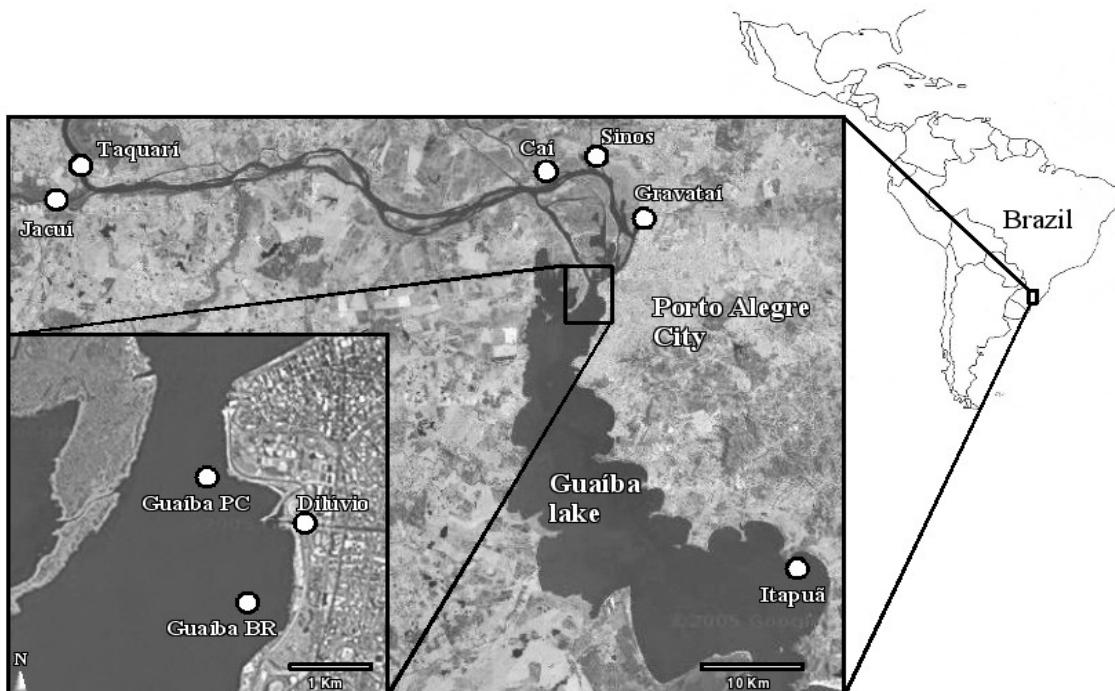


Figure 1: Map showing the Guaíba hydrographic region in Rio Grande do Sul State (Brazil) and the sampling sites (adapted from Google maps, 2006).

Table 1: Main contamination sources in the sampling sites

Sampling site	Main contamination sources
Itapuã preservation area	control site - minimal antropogenic impact
Dilúvio brook	urban effluents, cross Porto Alegre city (1,2 million inhabitants)
Guaíba lake	urban effluents, two sites near Porto Alegre city
Gravataí river	urban effluents, cross metropolitan region
Sinos river	metal works and leather and shoe manufacturing
Caí river	metal mechanic, urban and petrochemical
Jacuí river	agricultural activities and a thermoelectric plant
Taquarí river	urban agglomerates, apple farms and food processing plants

2.2. Animals

L. fortunei individuals were collected in the Itapuã State Park preservation area (RS, Brazil), which is an uncontaminated area protected by the environmental department of the state government (SEMA/ RS, 2006). As described by Villela et al (2006), individuals were collected and immediately transported to the laboratory. About 80 animals were placed in one of the nine available aquaria containing 2 liters of water from the collection site, and kept under constant aeration at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Animals were fed every two days with feed for herbivorous fish, prepared by blending it with water. Experiments started after an adaptation period from 7 to 20 days – this period was determined per experiment. All genotoxic assays were performed using the hemolymph cells of the mussels. The hemolymph was collected in the posterior adductor muscle with a hypodermic needle while the mussels were still alive, and the animals euthanized immediately after collection. Sixteen individuals were analyzed in pools of 4 to enhance cell concentration in order to simplify the visual scoring for each exposure dose and control group of each assay.

2.3. Exposure to environmental samples

Eighty individuals were collected from Itapuã (control site) and exposed to samples from each sampling site and from each sampling period. Individuals were kept for 7 days in aquaria containing 2 ± 0.1 L of water sample plus 100 ± 5 g of sediment sample. Every 24 h, $\frac{1}{4}$ of the total volume of water and sediment was changed. Molluscs kept in water and sediment from Itapuã were used as negative controls. Positive control for SCGA was performed with UVC radiation 4.5 J/m^2 , and pentachlorophenol 150 ppb was used for MN, as described by Villela et al. (2006). Animals were not fed during exposure.

2.4. Comet assay

The SCGA was performed and analyzed as described by Villela *et al.* (2006). Briefly, 10 μ l of haemolymph from the pool of 4 animals were centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and then were added to 90 μ l of LMP agarose 0.75% (w/v), mixed, and placed on a microscope slide pre-coated with normal melting point agarose 1.5% (w/v). A coverslip was added, and the slides immediately placed on ice. After agarose solidified, coverslips were removed, and the 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. The slides were kept frozen in lysis solution (4°C), and protected from the light for at least 1h and at most 3h. They were subsequently incubated in freshly-prepared alkaline buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH 12.1, which was experimentally determined) for 20 min for DNA unwinding. Electrophoresis (15 minutes at 270 mA and 21V (0.8 V/cm)) was performed in the same buffer. Every step was carried out under indirect yellow light. After electrophoresis, the 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. The 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, silver nitrate 0.1% w/v, tungstosilicic acid 0.25%, formaldehyde 0.15% w/v, freshly prepared in the dark), and constantly shaken for 35 minutes. The stained slides were rinsed twice with distilled water, and submerged in the stop solution (acetic acid 1%), rinsed again, and immediately tagged for analysis. Each replicate consisted of a pool of 4 individuals, and 4 replicates were prepared per concentration.

From each replicate 100 cells were randomly chosen (50 from each duplicate slide), and analyzed under optical microscope. For damage index calculation, cells were sorted out into four classes, according to tail size. The damage index (DI) is the sum of classes of the 100 cells analyzed, and may vary from 0 (all cells undamaged – 0 X 100) to 400 (all cells highly damaged – 4 X 100). The 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. The damage frequency (DF) was calculated as the percentage of cells with a tail.

2.5. The micronucleus test

The MN test was also carried out as described by Villela *et al.* (2006). Haemolymph was collected in a syringe with had been washed with EDTA (10mM), and fixed with an equal volume of sodium citrate (1%) for 5 min. and with 40% of formalin (4%) for 10 min. After fixation, haemolymph was centrifuged for 8 min. at 1000 rpm and the supernatant was removed, leaving a sufficient quantity to re-suspend the cells. These were gently placed on the slide to prevent membrane damage. After overnight drying at room temperature, slides were stained for 7 min in a solution of Giemsa at 3%. One thousand cells with complete cytoplasm were analyzed in each slide, and the presence or absence of MN was recorded. Each slide was produced from a pool of 4 individuals, and 4 slides were prepared per concentration. MN were identified according to the following criteria: spherical cytoplasmic inclusions with a defined contour, diameter smaller than approximately 1/3 of the main nucleus, color and texture similar to the nucleus, and absence of contact with the nucleus.

2.6. Chemical analysis

Metal content in the samples was analyzed by PIXE (Particle-Induced X-ray Emission) due to its high sensitivity, simplicity, and capacity to detect several elements simultaneously (Johansson *et al.*, 1995). All mussel samples were completely dried at 60°C for 24h, ground into a fine powder, and then pressed into thick pellets which were placed in the PIXE target-holder inside a reaction chamber under pressure of about 10-5 mbar. PIXE analyzes were carried out at the Ion Implantation Laboratory of the Physics Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul using a 3.0 MV Tandetron accelerator, delivering a 2.0 MeV

proton beam with an average current of about 1 nA at the target. X-rays produced in the target were detected by a Si(Li) detector with an energy resolution of 155 eV at 5.9 keV. The data acquisition system was optimized to allow X-rays energies up to 15 keV. The spectra were analyzed with the GUPIX code (Campbell *et al.*, 2000) developed at the University of Guelph (Canada).

Physical-chemical analysis, such as temperature, pH, conductivity, and dissolved oxygen were performed during sampling.

2.7. Statistics

Mutagenic and genotoxic results from the control and exposed animals were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's multiple comparisons of means. Correlation between mutagenic/genotoxic results and physical-chemical parameters/inorganic elements was calculated using Pearson's parametric linear correlation.

3. Results

During the summer of 2004, all results of damage index and damage frequency were higher than all the other samples, with DI ranging from 143 to 324, and DF from 44 to 86. It is important to note that, during that season, there was a long draught, with low rainfall, and high evaporation rate (Figure 2a). These climate conditions probably dramatically affected mussels fitness, reducing the population and affecting the health of the individuals (data not shown), and therefore it is very difficult to determine if DNA damage was induced by climatic stress conditions or by genotoxicological contamination. For this reason, summer collection was repeated in 2005, and the SCGA results for the summer of 2004 were not considered in the analysis. Rainfall deficit was not as severe in 2005 as compared to 2004 case (Figure 2b), which might have reduced the impact of the climatic conditions on the mussels fitness. There were no differences in MN in

samples from the summer of 2004 as compared to the summer 2005 (data not shown). Due to the characteristics of this test, these results were not influenced by the climate conditions during this season. In this context, MN results are presented as the average of the two summer samples.

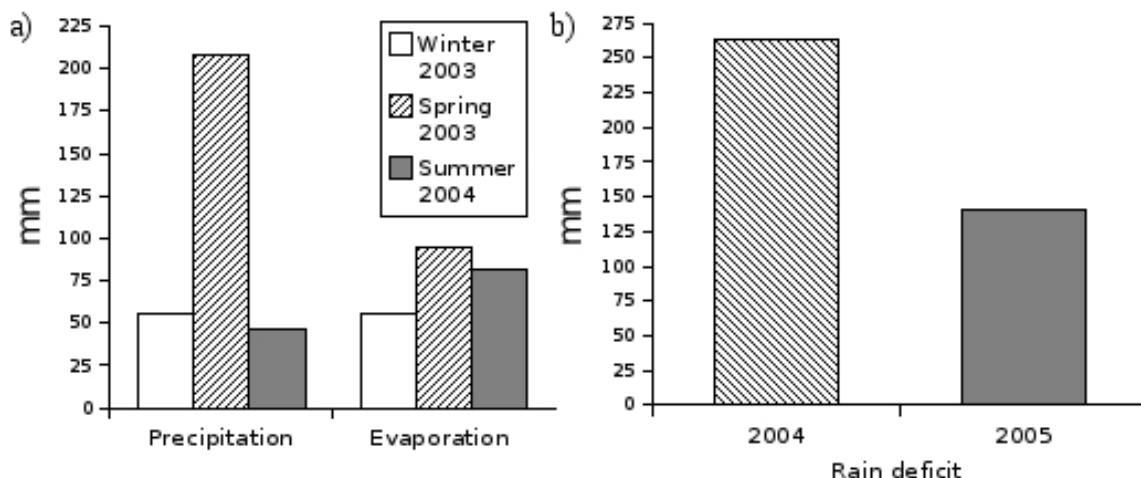


Figure 2: Climate data of the studied region during the sampling periods. a) Expressed as total season values. Source: 8 DISME; b) Expressed as total deficit during the first semester of the year. Source:<www.estiagem.com.br/website/default.asp?CodArea=53&Secao=86&Subsecao=277>

Table 2 shows the level of DNA damage by SCGA in *L. fortunei* haemolymph cells after exposure, expressed as Damage Index and Damage Frequency. As compared to the control site (Itapuã), the sites Dilúvio, Guaíba BR, and Gravataí induced significant increase in DNA damage during the winter. During spring, only the sampling performed at Jacuí presented positive results. During the summer of 2005, there was a significant increase in DI and DF in samples collected at Dilúvio and Guaíba BR sites.

Results for MN test are presented in Table 3. During winter, Dilúvio, Guaíba PC, Gravataí, and Taquarí induced significant micronuclei increase. The samples collected at Guaíba BR site were the only that presented damage increase during the spring. Samples collected during the summers of 2004 and 2005 showed significant responses for Dilúvio, GuaíbaPC, Gravataí, Jacuí, and Taquarí sites.

Table 2: Detection of DNA damage by the comet assay in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* individuals exposed to environmental samples from Guaíba basin.

Sampling site	Winter /2003		Spring /2003		Summer/2005	
	DI	DF	DI	DF	DI	DF
Itapuã	28.0±11.6	11.0±2.8	17.7±3.8	11.0±3.6	42.9±9.9	15.1±9.9
Dilúvio	66.7±12.7**	22.7±3.5*	24.7±6.5	14.0±2.6	99.5±60.1**	34.5±18.6*
Guaíba BR	50.5±4.8**	17.5±2.4*	25.3±4.0	9.7±1.5	104.0±25.5*	35.5±9.8*
Guaíba PC	44.5±7.9	15.0±1.6	19.0±1.0	9.3±1.5	66.0±44.3	23.1±15.3
Gravataí	57.3±7.6**	16.3±1.7	25.7±8.4	12.0±4.6	45.2±22.6	15.0±5.9
Sinos	30.7±3.2	10.8±2.2	22.8±4.7	9.3±2.6	44.8±22.9	17.0±9.4
Caí	30.0±8.9	10.3±3.2	29.3±2.1	14.0±1.7	15.3±8.1	5.5±1.9
Jacuí	31.0±5.3	10.8±3.0	52.3±15.3*	22.3±6.0*	22.6±12.8	9.5±5.2
Taquarí	36.3±12.2	12.5±4.5	30.3±6.1	16.7±4.7	54.8±23.3	23.4±10.6

Damage Index (DI) and Damage Frequency (DF) are expressed as mean ± S.D values obtained from an average of 100 cells per pool. In each group: n= 16 / 4 animals per pool, 4 pools per group. Significant at * P< 0.05, ** P< 0.01; in all cases significance was tested relative to 0 (control) using ANOVA and Dunnet's test. Positive control, UVC radiation 4.5 J/m², DI= 103 - 300 and DF= 34 - 81%.

Table 3: Detection of micronuclei frequency in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* individuals exposed to environmental samples from Guaíba basin.

Sampling site	Winter /2003	Spring /2003	Summer /2004/2005
Itapuã	3.0±0.8	3.5±0.6	3.3±0.7
Dilúvio	5.0±0.8**	5.3±1.3	5.6±1.9**
Guaíba BR	4.8±1.0	6.0±1.4**	4.0±0.8
Guaíba PC	5.3±1.0**	4.3±0.5	6.4±1.6**
Gravataí	5.5±1.0**	4.8±0.5	5.3±1.0*
Sinos	4.5±0.6	4.8±1.0	4.8±1.5
Caí	4.8±1.0	4.3±0.5	4.2±1.1
Jacuí	4.7±0.6	4.7±1.2	6.9±0.9**
Taquarí	5.3±1.0**	4.5±0.6	6.4±1.3**

Number of micronuclei are mean ± S.D value obtained from an average of 1000 cells per pool. In each group: n=16 / 4 animals per pool, 4 pools per group. Significant at * P< 0.05, ** P< 0.01; in all cases significance was tested relative to 0 (control) using ANOVA and Dunnet's test. Positive control, pentachlorophenol 150 ppb 14 - 18 MN/1000 cells.

Inorganic element content in the mussels' body was analyzed by PIXE. The presence of 13 different elements was detected in the nine sampling sites during the different sampling periods (Figure 3). The analysis of the correlation between genotoxic and mutagenic responses and physical-chemical and inorganic results was conducted by combining data per season and per sampling site. Very few significant correlations were observed. Sampling site analysis presented correlation for the SCGA between Guaíba BR and Pb (Pearson's correlation coefficient: 1.0, $p<0.01$). Micronuclei presented the same correlations found for SCGA between Dilúvio and Rb (Pearson's correlation coefficient: 1.0, $p<0.01$), Gravataí and Sr (Pearson's correlation coefficient: 0.99, $p<0.01$) and Pb (Pearson's correlation coefficient: 1.0, $p<0.01$). Jacuí presented significant correlation with Cr (Pearson's correlation coefficient: 1.0, $p<0.01$) and with Pb (Pearson's correlation coefficient: 1.0, $p<0.01$).

Physical-chemical analyses were performed during sampling (Table 4). There was a slight increase in pH values from winter to spring and during summer in all sampling sites, and this was more pronounced in Gravataí, Sinos, and Caí. Conductivity decreased during the spring in all sampling sites, being higher during all seasons in Dilúvio and Gravataí sampling sites. This was positively correlated with mutagenic responses during winter (Pearson's correlation coefficient: 0.749, $p<0.05$). During the different sampling periods, dissolved oxygen remains nearly constant in the different sampling sites, showing the smaller values in the Dilúvio, Gravataí and Sinos sampling sites.

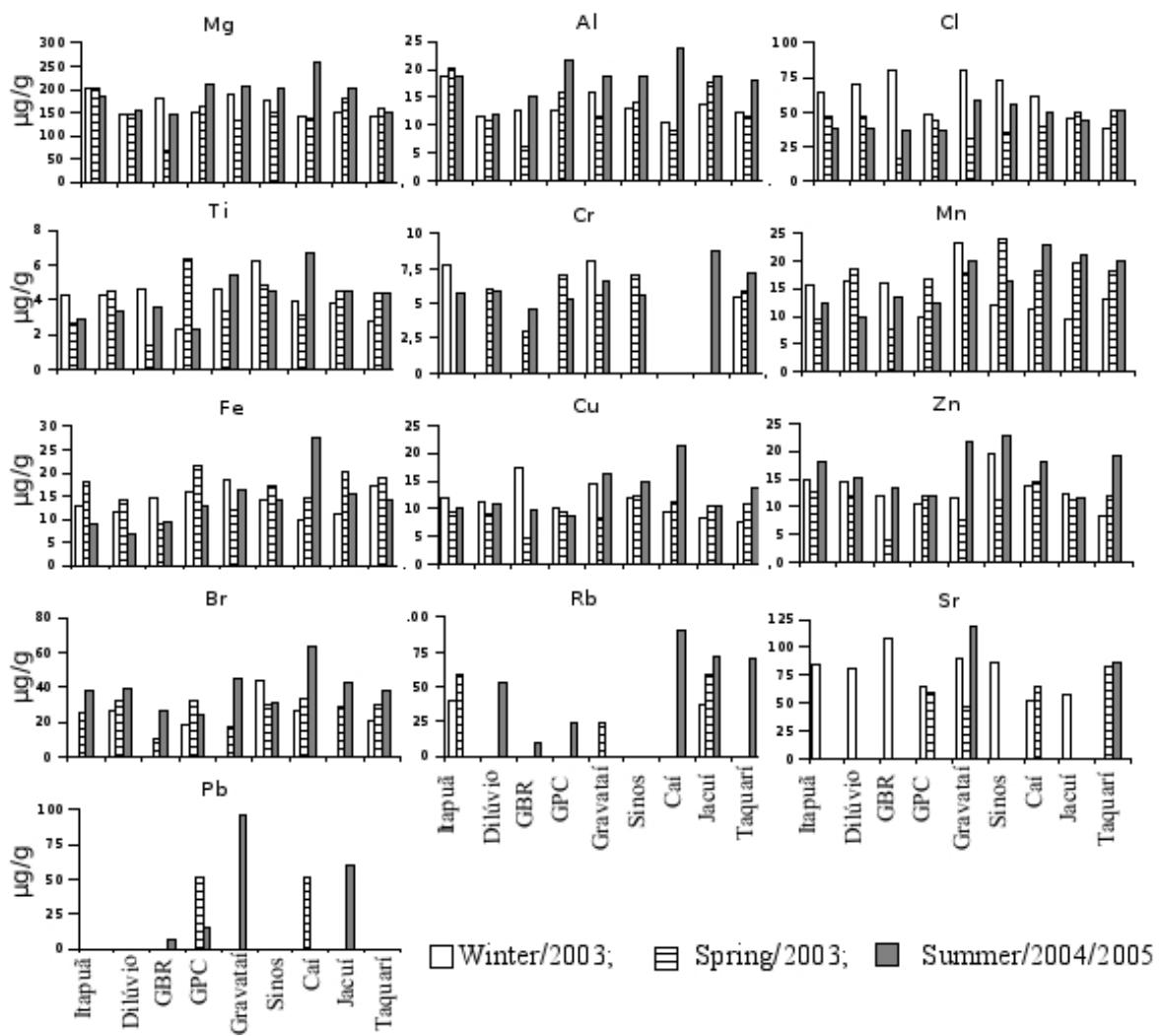


Figure 3: Inorganic elements detection by PIXE analyzes in the entire body of *Limnoperna fortunei* individuals exposed to environmental samples from Guaíba basin. Element contents are expressed in $\mu\text{g/g}$ dry body weight.

Table 4: Data from physical-chemical analysis carried out *in situ* during sampling.

	Dilúvio	Guaíba BR	Guaíba PC	Gravataí	Sinos	Caí	Jacuí	Taquarí
Winter								
pH	6.5	5.9	5.8	5.5	5.9	6.1	6.3	6.6
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	423.0	77.0	74.3	205.0	145.0	104.6	59.8	82.5
Dissolved oxygen (mgO_2/l)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Spring								
pH	7.1	6.2	6.2	6.11	6.8	6.7	6.6	6.9
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	310.0	45.0	44.0	78.0	72.0	53.0	37.0	41.0
Dissolved oxygen (mgO_2/l)	1.0	6.1	6.2	3.3	3.6	5.7	5.8	6.7
Summer								
pH	7.1	6.5	6.5	6.8	6.7	6.9	6.4	6.7
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	461.0	72.0	83.0	338.0	269.0	147.0	51.0	63.0
Dissolved oxygen (mgO_2/l)	0.8	6.3	5.8	0.1	1.3	5.5	7.8	7.8

NA:Not Available. Data from Itapuã sampling site are not available.

4. Discussion

Different sampling sites were evaluated to understand the genotoxicological contamination contribution of the different rivers flowing to the Guaíba Lake, and the relation with inorganic contaminants. The SCGA is known to be more sensitive in detecting genotoxicity than the micronuclei assay (Mitchelmore and Chipman, 1998). However, several studies showed positive results for MN, accompanied by negative results for SCGA (Bombail *et al.*, 2001; Klobucar *et al.*, 2003). Our data shows that MN is responsible for almost 60% of the positive results. This difference may be attributed to the distinctive nature of the two assays, as both, in addition to genotoxicity, can reflect different forms of environmental stress (Mitchelmore and Chipman, 1998). While the MN detects non-repairable damages, such as clastogenic and aneugenic lesions, SCGA detects recent lesions that can be repaired, such as breaks and alkali-labile sites (Klobucar *et al.*, 2003). Thus, the results observed in this study for SCGA relates to DNA damage processes that can be repaired, while the observed micronucleus persists until the end of the cell

life. The summer of 2005 presented a small increase in DNA damage as compared to winter and spring. This difference was expected as it is well known that temperature can potentially induce increase in DNA damage baseline levels (by SCGA) in untreated mussels, and also affect cell sensitivity to environmental pollutants under *in vitro* conditions (Buschini *et al.*, 2003). However, MN frequency (only the summer 2004/2005 average is presented) remained stable, conferring reliability to the results. These different characteristics seem to complement each other, and thus, the combined use of these two assays is advantageous.

When data were analyzed according the season of the year, activity during summer and winter showed to be similar between these seasons, but higher than during spring. In general, samples that were positive in winter were also positive in summer, and this was also correlated with urban contaminated regions, such as Dilúvio, Guaíba and Gravataí. In the studies of Horn *et al.* (2004) and Amaral *et al.* (2005b) in the same hydrographic region, spring also presented less positive results as compared to other seasons. Physical-chemical data from all samples show that conductivity was lowest in spring, probably because this season presented the highest rainfall of all four sampling periods – nearly four or five times higher (Figure 2). It is reasonable to think that contaminants were diluted during this season by the large amounts of water, thereby reducing their detection by the bioassays. Conductivity was positively correlated with mutagenic responses in winter, which may indicate higher level of mutagenic suspended elements. The literature, supported by our results, indicates that seasonal variation can indeed be related to different factors. In the Taihu lake for instance, seasonal variation in mutagenic responses were also found, with winter samples showing the strongest mutagenic potential (Wu *et al.*, 2004). These authors suggest that meteorological and hydrological factors can affect the water quality. Urban influence was also observed in this region, with strong mutagenicity found at the near-shore area or at the vicinity of an industrial city.

Dilúvio, Gravataí, GuaíbaBR and GuaíbaPC sampling sites were mainly contaminated with urban effluents, and were responsible for 75% of the positive

results induced by the Guaíba lake hydrographic region samples. In order to confirm the influence of these sewage discharges, historical Biological Oxygen Demand (BOD) and Coliform data, obtained from a government physical-chemical monitoring program, are shown in Figure 4. These results show higher BOD and Coliform values at Dilúvio, Gravataí and Guaíba sampling sites, indicating a strong urban influence in these areas (FEPAM, 2006; CONCREMAD, 2005). Gravataí river and Dilúvio brook induced genotoxic and mutagenic responses during all studied seasons, except for spring. Both water bodies receive large amounts of untreated urban sewage from the metropolitan region of Porto Alegre (state capital). The Dilúvio brook was studied by the comet assay in planarians, and a relation was observed between urbanization and genotoxicity increase (Prá *et al.*, 2005). Also, near urban sewage discharges, the two sampling sites in the Guaíba basin presented positive results in different sampling periods. Correlations with Pb, Sr, and Rb were found in this area, which are difficult to relate to hazardous wastes of unspecified origin. The presence of most of the mutagenic positive results in the region, mainly contaminated by urban effluents, was expected, as shown by different studies (White and Rasmussen, 1998; Ohe *et al.*, 2003). It is reasonable to think on urban effluents as the largest problem in Guaíba lake basin: 960,000 m³ sewage are daily discharged there, and only 30% of this amount is treated before discharge as compared to 890 m³ of industrial waste, and 16,500 L of pesticides (Pró-Guaíba, 2006). In fact, the problem is not only related to the toxicity of the effluent, but also to the amount discharged. Industrial effluent can be more toxic than urban effluents, although urban contamination is of higher concern because the quantity enhanced its effects.

Sinos river is under urban-industrial influence, particularly of metal works and leather and shoe manufacturing, which is the largest in the Guaíba Hydrographic Region (FEPAM, 2001). No significant DNA damage induction and MN was observed in Sinos samples, probably because sampling were done in the mouth of the river, where contaminants were diluted and in low concentration to induce genotoxicity. On the other hand, the sediment of this river induced mutagenic activity in *Salmonella*/microsome assay and in microscreen phage-induction

assay, which could indicate metal contamination, especially of Fe, Ni, Cr, Mn, Cu, and Zn, as detected in chemical analysis (Vargas, *et al.*, 2001). Considering that eukaryotic organisms are more complex and have more defenses than prokaryotic organisms, these results may suggest that the 7-day exposure in the water and sediment samples of Sinos river were not enough to accumulate the metal content present in the sediment, but they were sufficient to detect other organic mutagenic sources.

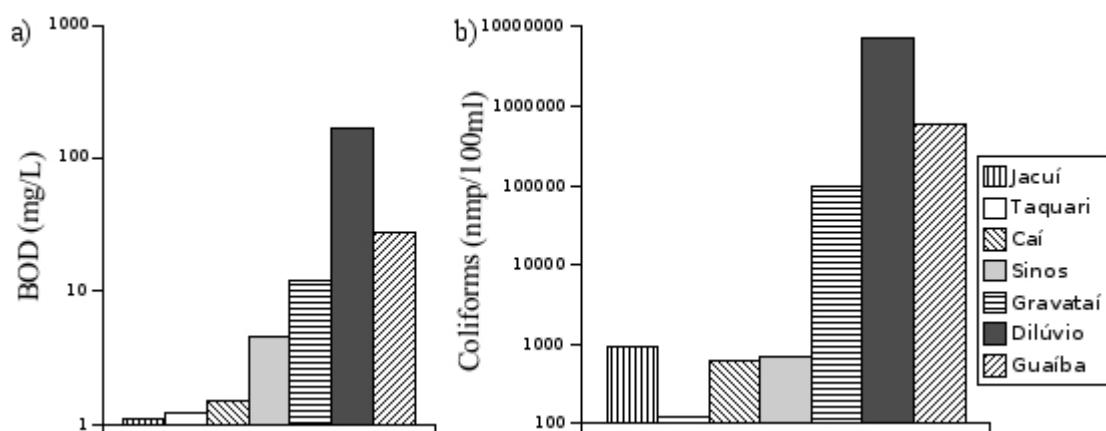


Figure 4: Historical physical-chemical data of a) Biochemical Oxygen Demand (BOD) and b) Coliform are presented as annual average. Guaíba data are from a sampling site between Guaíba PC and Guaíba BR, and represents *E. coli* data instead of coliform data. Source: FEPAM 2006 and CONCREMAD, 2005.

Caí river did not show damage by SCGA and MN induction, as in Sinos river sampling were done in the mouth of the river and the contaminants were possibly diluted and not in enough concentration to induce genotoxicity. Ti, Rb, Fe, Mg, Al and, Cu were found in the samples, probably caused by mechanic and metal works, extensively present among the sides of this river (FEPAM, 2001). This kind of genotoxic contamination is generally detected by *Salmonella*/microsome assay (Houk, 1992). Using the SMART test along the river, Amaral *et al.* (2005a, 2005b) found induction linked to direct-acting recombinogenic toxicants in the winter, probably related to the urban influence of Caxias do Sul region, located in a mountainous region. Other studies in the Caí river basin, suggested an important influence of a petrochemical complex on the mutagenic activity of environmental samples of the river (Vargas *et al.*, 1988, 1993, 1995; Lemos *et al.*, 1994, 2000).

Jacuí basin has the only thermoelectric plant of the region (FEPAM, 2001).

Samples taken from this basin presented the only SCGA positive results during the spring, and positive MN in a summer sample. Spring had the highest rainfall, which possibly carried to the river a large amount of compounds from coal mining, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), introducing into the water a large amount of known genotoxic agents. These are better detected by the SCGA, as described by Silva *et al.* (2000). This kind of agent causes damage that is quickly repaired and it is detected positive in SCGA and negative in MN test. This fact helps to understand the correlation found between micronuclei frequency and the presence of chromium and lead, which are probably discharged by coal mining, and were concentrated due to the low rainfall during the studied summers and consequent decrease in river volume. The runoff of pesticides from the large rice, corn, soy, and wheat production areas located in this region may also contribute to these findings. Amaral *et al.* (2005b) detected direct recombination activity in samples collected in this area during the summer, which may also be a consequence of other industries present in this basin.

Taquarí River presented positive responses in MN during the winter of 2003 and summers of 2004 and 2005. Food processing plants are widely distributed in this region. According to Houk (1992), micronuclei and other chromosomal morphological features can be induced by this kind of effluent, confirming our results. The contamination from apple farms also can contribute to these responses. Chemical Oxygen Demand (COD) load analyzed in this river is higher as compared to the others in this hydrographic region (FEPAM, 2001), which indicates high concentrations of organic and inorganic matter, according to the river use. Another study carried out at the same sampling site also showed induction of DNA rearrangements by direct or recombinogenic toxic substances during winter and summer (Amaral *et al.*, 2005b). No correlations between mutagenic responses and inorganic elements were found in the Taquarí River, although copper and other possible toxic elements were found in all samples, suggesting induction by organic compounds.

This study supports the use of hemolymph cells of individually exposed

Limnoperna fortunei for 7 days under laboratory conditions to monitor genotoxicity of freshwater systems, particularly of urban contaminated sites. This idea agrees with the fact that genotoxicity was not detected in most industrial rivers, Caí and Sinos, where mutagenicity as already described in the literature. This probably suggests higher efficiency of *Limnoperna fortunei* in detecting urban contaminants, as supported by the weak relation found between mutagenic and genotoxic responses and mussels inorganic element contents. Our results suggest that the analyses of the biological responses to contaminants seem to be a better indication of pollution of the Guaíba Lake as compared to inorganic elements analyses in mussel body. It must be understood that the effects of toxic metals are not related to absolute body concentrations, but are manifested only when the rate of uptake exceeds the rates of detoxification and or excretion of the organism. An invertebrate with low total metal concentration may be suffering sub-lethal effects resulting from a recent exposure, whereas others may not present toxic effects, despite containing a much higher metal concentration accumulated in detoxified form over an extended time period (Rainbow, 1996). Is strongly recommended, the use of other mutagenicity tests, such as the Ames test, especially in urban contaminated areas in order to complete, confirm and to understand the sources of contamination. The use of *Limnoperna fortunei* *in situ* is also very interesting to observe differences between populations and minimal effects under laboratory conditions.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conservation Unit Division (Divisão de Unidades de Conservação) of the Environmental Department of the State Government (SEMA-RS) for granting us permission to collect samples inside Itapuã State Park (RS, Brazil) and to COPESUL, GENOTOX -UFRGS, CAPES , CNPq and FAPERGS for their financial support.

References

- Amaral, V.S.; Medina-Silva, R.; Reguly, M.L.; Andrade, H.H.R. Drosophila wing spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat. Res.* 583: 67-74; 2005a.
- Amaral, V.S. do; Sinigaglia, M.; Reguly, M.L.; Andrade, H.H.R. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the Drosophila Wing-Spot Test. *Env. Pollut.* 139 (3): 469 - 73; 2005b.
- Bolognesi, C.; Buschini, A.; Branchi, E.; Carboni, P.; Furlini, M.; Martino, A.; Monteverde, M.; Poli, P.; Rossi, C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci. Tot. Environ.* 333 (1-3): 127 - 36; 2004.
- Bombail, V.; Aw, D.; Gordon, E.; Batty, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth. Scotland. *Chemosphere.* 44: 383-392; 2001.
- Buschini, A.; Martino, A.; Gustavino, B.; Monfrinotti, M.; Poli, P.; Rossi, C.; Santoro, M.; Dörr, A.J.M.; Rizzoni, M. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutat. Res.* 557: 119-129; 2004;
- Campbell, J.L.; Hopman, T.L.; Maxwell, J.A.; Nejedly, Z. The Guelph PIXE software package III: alternativa proton database.. *Nucl. Instrum. and Meth in Phys. Res. B.* 170: 193 - 204; 2000.
- CONCREMAD engenharia. Technical report: Relatório temático A1; Diagnóstico das disponibilidades hidricas da bacia hidrográfica; Estudos preliminares para subsidio ao plano de bacia da Lago Guaíba; 2005.
- FEPAM, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Luiz Henrique Roessler- RS; web page <<http://www.fepam.rs.gov.br>> ; 2006.
- FEPAM, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Luiz Henrique Roessler- RS. Technical report: Diagnóstico da poluição Hídrica industrial na região hidrográfica do Rio Guaíba; 2001. Available in <<http://www.fepam.rs.gov.br/biblioteca/diagrquaiba.asp>>.
- Guimmler-Luz, M.C.; Erdtmann, B.; Balbueno, R.A. Analysis of clastogenic effect of Porto Alegre drinking water supplies on mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.*

279: 227 – 231; 1992.

Horn, R.C.; Rocha, J.A.V.; Vargas, V.M.F. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis*. 19(6): 445-451; 2004.

Houk V.D. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 277: 91-138; 1992.

Kennedy,V.J.; Augusthy,A.; Varier,K.M.; Magudapathy,P.; Panchapakesan,S.; Ramesh,C.; Nair,K.G.M.; Vijayan,V. PIXE analysis of trace pollutants in Chaliyar river water in Malabar, India. *Nucl. Instrum. and Meth in Phys. Res. B*. 134: 224 – 228; 1998.

Johansson, S.A.E.; Campbell, J.L.; Malmqvist, K.G. Particle-Induced X-ray Emission Spectrometry (PIXE). John Wiley & Sons Inc; 1995.

Klobucar, G.I.V.M.; Pavlica, M.; Erben, R.; Papes, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol.* 64: 15-23; 2003.

Lemos, C.T.; Erdtmann, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutat. Res.* 467: 1-9; 2000.

Lemos, C.T.; Vargas, V.M.F.; Henriques, J.A.P.; Mattevi, M.S. Genotoxicity of river water under the influence of petrochemical industrial complexes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 848 – 855; 1994.

Lermiere, S.; Cossu-Leguille, C.; Bispo, A.; Jourdain, M.-J.; Lanher, M.-C.; Burnel, D.; Vasseur, P. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill. *Mutat. Res.* 581: 11-21; 2005.

Liu, J.H.; Kueh, C.S.W.; Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51 (8 – 12): 857 - 75; 2005.

Mansur, M.C.D.; Quevedo, C.B.; Santos, C.P.; CALLIL, C.T. Prováveis vias de introdução de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Molusca, Bivalvia, Mytilidae) na Bacia da Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul e novos registros de invasão no Brasil, pelas Bacias do Alto Paraná e Paraguai, in: Silva, J.S.V. da; de Souza, R.C.C.L. Água de Lastro e Invasão. 33-38; 2004.

Mersch, J.; Beauvais, M.N.; Nagel, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutat. Res. 371: 47-55; 1996.

Mitchelmore, C.L.; Chipman, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in the environmental monitoring. Mutat. Res. 399: 135 – 147; 1998

Ohe, T.; White, P.A.; De Marini, D.M. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. Mutat. Res. 534: 101 - 112; 2003.

Ohe, T.; Watanabe, T.; Wakabayashi, K. Mutagens in surface waters: a review. Mutat. Res. 567: 109 - 149; 2004.

Pastorino, G.; Darrigran, G.; Martin, S.; Lunaschi, L. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del río de La Plata. Neotropical. 39: 101-102; 1993.

Pavlica. M.; Klobucar, G.I.V.M.; Mojas N.; Erben R.; Papes D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. Mutat. Res. 490 :209 – 214; 2001.

Pavlica, M.; Klobucar, G.I.V.M.; Vetma, N.; Erben, R.; Papes, D. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. Mutat. Res. 465: 145 – 150; 2000.

Prá, D.; Lau, A. H.; Knakievicz, T.; Carneiro, F. R.; Erdtmann, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarian. Mutat. Res. 585 (1-2): 79 - 85; 2005.

Pró Guaíba, Programa para o Desenvolvimento Sócio Ambiental da Região Hidrográfica do Guaíba; web page <<http://www.proguaiba.rs.gov.br>>; 2006.

Rainbow, P.S. Heavy metals in aquatic invertebrates. In: Beyer, W.N.; Heinz, G.H.; Redmon-Norwood, A.W. Environmental contaminants in wildlife. Interpreting tissue concentrations. SETAC, Lewis Publishers. 405-425; 1996.

Ralph, S.; Petras, M. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. Mutat. Res. 413: 235-250; 1998.

SEMA/ RS, Governo do Estado do Rio Grande do Sul; web page Secretaria Estadual do Meio Ambiente – SEMA-RS

<<http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/bioconh5.html>> ; 2006.

Silva, J.; Freitas, T.R.O.; Marinho, J.R.; Speit, G.; Erdtmann, B. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics Mol. Biol.* 23: 241-245; 2000.

Vargas, V.M.F.; Guidobono, R.R.; Jordão, C.; Henriques, J.A.P. Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutat. Res.* 343: 31-52; 1995 .

Vargas, V.M.F.; Migliavacca, S.B.; Melo, A.C.; Horn, R.C.; Guidobono, R.R.; Ferreira, I.C.F.S.; Pestana, M.H.D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat. Res.* 490: 141-158; 2001.

Vargas, V. M. F.; Motta, V. E. P.; Henriques, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319: 31- 45; 1993.

Vargas, V. M. F.; Motta, V. E. P.; Henriques, J. A. P. Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames test (*Salmonella*/microsome). *Revista Brasileira de Genética.* 11 (3): 505–518; 1988.

Villela, I.V.; Oliveira, I.M.; Silva, J.; Henriques, J.A.P. DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) Exposed to Environmental Contaminants. *Mutat. Res.* 697: 78 – 86, 2006.

White, P.A.; Rasmussen, J.B. The genotoxic of domestics wastes in suface waters. *Mutat. Res.* 410: 223 – 238; 1998.

Wu, T.; Sempos, C.T.; Freudenheim, J.L; Muti, P.; Smit, E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of câncer mortality in US adults. *Ann Epidemiol.* 14: 195-201; 2004.

**V Capítulo 3 - Study on Environmental Quality
Evaluation in a Region Under the Influence of Urban
waste in the Guaíba lake basin (Brazil).**

A ser submetido a Aquatic Toxicology

Study on Environmental Quality Evaluation in a Region Under the Influence of Urban waste in the Guaíba lake basin (Brazil).

Izabel Vianna Villela ^a

Juliana da Silva ^{a, b}

Iuri Marques de Oliveira ^a

Miriana da Silva machado ^a

Johnny Ferraz Dias ^c

João Antonio Pêgas Henriques ^{a, b *}

^a GENOTOX/ Centro de Biotecnologia/ PPG em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421, Campus do Vale, Caixa Postal 15005, CEP 91501970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratório de Genética Toxicológica - Curso de Biologia/ Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil.

^c Laboratório de Implantação Iônica, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author, Tel.: +55 51 33166069; fax: +55 51 33166084

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br

Abstract

The mussel species *Limnoperna fortunei* was chosen as a biomonitoring organism in the Guaíba Basin, based on population data, distribution, and sensitivity. Previous studies *in vitro* and *in vivo* with Single Cell Gel Test (SCGT) and Micronuclei test (MN) in this freshwater mussel have shown to be successful in biomonitoring studies, especially in urban pollution monitoring. This could be observed by using this model to assess the genotoxicity in samples from the rivers that flows to the Guaíba Lake and in the lake; urban influence could be identified as the main contamination source of genotoxins in this river basin region. In this context, this study evaluated two sampling sites in the Guaíba Lake, near urban waste discharges, comparing mutagenic contamination in surface water and sediment interstitial water, using the *Salmonella*/Microsome assay. *L. fortunei* individuals, sampled *in situ* and exposed to laboratory conditions were also tested by SCGA and MN in haemolymph cells. Only one sample of surface water, Guaíba BR, presented mutagenicity in the TA98 in the presence of metabolic activation. This sample also induced DNA damage in mussel haemocytes exposed in laboratory and sampled *in situ* and MN only in the *in situ* animals. The samples of Guaíba PC increased MN frequency *in situ* and in laboratory conditions. Metal influence seems to be less important than organic influence in genotoxic induction. These results confirm the strong urban influence in this region, showing that biomonitoring is a powerful tool to detect this kind of contamination in water bodies.

Key words: *Limnoperna fortunei*, water genotoxicity, urban contamination, comet assay, micronucleus test, Ames test, Guaíba basin.

1. Introduction

Environment contamination can produce multiple consequences at the organism, population and ecosystem levels. It may affect cell metabolism, DNA, organ function, fertility, population size, species survival and biodiversity. Direct chemical analyses of environmental samples are limited by the sensitivity and availability of detection methods and by an inability to predict the toxicity of complex mixtures (Bolognesi *et al.*, 2004). Water is essential for life in the planet and is not a renewable source, for these reasons monitoring freshwater quality is of special interest. Surface freshwater receives directly large quantities of waste water from domestic, agricultural and industrial sources and indirectly by the runoff from the soil and the precipitation from the air. Urban contamination, mainly from big cities, is of special concern due to the large amount of complex mixed wastes, derived mostly from sanitary and industrial activities (White *et al.*, 1998; Prá *et al.*, 2005)

The application of genetic end-points for monitoring the environmental impact of a large number of substances and complex mixtures is strongly recommended, due to the wide variety of chemicals that affect DNA (Bickham *et al.*, 2000). Different biomarkers can be used, the classic *Salmonella*/microsome assay (Ames test) is the most widely used mutagenicity assay in surface water (Ohe *et al.*, 2004), being recommended by different environmental agencies, and in sediment samples (Chen and White, 2004) to assess aquatic environmental quality. It is also very useful to employ bivalve mollusks as biomonitoring, since they are filter feeders, are motionless and have the capacity to accumulate contaminants (Pavlica *et al.*, 2001). Exotic fresh water bivalves have been widely used in monitoring studies (Pavlica *et al.*, 2000 and 2001; Klobucar *et al.*, 2003 and Bolognesi *et al.*, 2004). Mussels from polluted sites can develop adaptive mechanisms, by using transplanted animals this response is reduced and the results are better compared because all individuals have a common genetic background (Klobucar et al, 2003; Ralph and Petras, 1998). Different tissues can

be used in monitoring assays. The use of haemolymph demands little manipulation reducing the possibility of damage. The physiological role in the transport of toxicants and in various defense mechanisms makes these cells get in close contact with environmental agents (Mersch et al., 1996).

The Guaíba basin, located in the southernmost state of Brazil, Rio Grande do Sul state (RS), is formed by nine sub-basins in an area with a population of approximately six million people living in 251 towns, more than 8,000 industrial activities and intensive agriculture (Pró-Guaíba, 2006). Different studies were performed in an attempt to evaluate the genotoxic contamination in this basin. Evaluations were conducted for years in specific sites of this basin by using the *Salmonella*/microsome assay (Ames test) (Vargas et al. 1988, 1993, 1995 and 2001; Lemos et al., 1994; Rola e Henriques, 1996 and 1997), SCE (Lemos et al. 2000), Chromosomal Aberration (Guimmler-Luz et al., 1992), comet assay (Prá et al., 2005) and the SMART test (Amaral et al., 2005a,b). Recently, the golden mussel (*Limnoperna fortunei*) was efficiently established as biomonitoring organism in this basin by using the Comet Assay (Single Cell Gel Assay - SCGA) and the Micronucleus Test (MN) (Villela et al., 2006). Using this biomonitoring organism to evaluate the mouth of the 5 major rivers that drains in Guaíba lake, the mouth of a brook that crosses Porto Alegre (1.2 million inhabitants) and 2 sites in the Guaíba lake near this city sewage discharge, the main urban contamination areas could be established as having the highest genotoxic and mutagenic potential (Villela et al., submitted). In this context, *Limnoperna fortunei* seems to be more sensitive to organic contaminants from urban origin. The authors suggested that the Guaíba Lake (Guaíba sub-basin) was the one most contaminated with genotoxins. This basin is strongly impacted by Porto Alegre sewage discharge and by some industrial activity, especially food, metallurgic and pulp and paper plants (Pró-Guaíba, 2006).

Hence, the aim of this study is to evaluate two sampling sites in the Guaíba Lake near sewage discharges in different sampling periods comparing mutagenic contamination in surface water and sediment interstitial water, using the

Salmonella/Microsome assay. *Limnoperna fortunei* individuals, sampled *in situ* and exposed to laboratory conditions were also tested by SCGA and MN in haemolymph cells. Correlations with inorganic element quantities were also observed.

2. Materials and Methods

2.1. Sample collection

Collection sites were : Two sites in the Guaíba lake near sewage discharges Guaíba PC ($30^{\circ} 03' S$, $51^{\circ} 24' W$) and Guaíba BR ($30^{\circ} 05' S$, $51^{\circ} 25' W$); and Itapuã ($30^{\circ} 38' S$, $51^{\circ} 05' W$), the control site for mussel sampling (Figure 1).

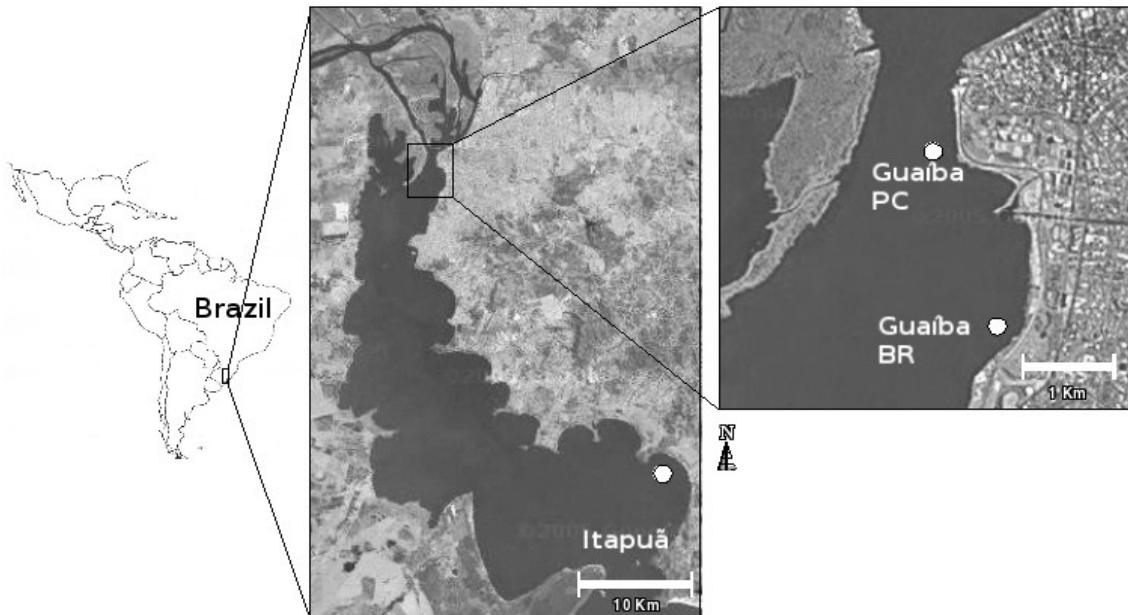


Figure 1: Map showing the Guaíba river basin region in Rio Grande do Sul State (Brazil) and the sampling sites (adapted from Google maps, 2006)

This study was performed in three stages, performed in different periods:

I – Surface water - Two samples: Summer and Winter (2000). Assays: *Salmonella*/microsome assay and PIXE;

II - Sediment interstitial water - Two samples: Winter and summer (2003/2004). Assay: *Salmonella*/microsome assay;

III - Biomonitoring with *Limnoperna fortunei* (Golden Mussel)- One sample: Summer (2005). *In situ* and laboratory exposure. Assays: Comet Assay, Micronucleus test and PIXE.

2.2. Samples treatment

Surface water samples were collected about 20 cm from the surface and sediment samples were collected with the help of a manual grab sampler. All samples were kept on ice until laboratory treatment.

A direct concentration method was used for the *Salmonella*/microsome assay. All water samples were sterilized by vacuum filter using Millipore filters with 0.22mm pores. The sediment samples were mixed with the same volume of distilled water, shaking for 24h and then centrifuged at 1100 g for 10 min to extract interstitial water. The later was sterilized as the water samples.

2.3. *Salmonella*/microsome assay

Salmonella typhimurium strains, TA97a, TA98, TA100 and TA102 used in this study were kindly provided by B. M. Ames (University of California, Berkeley, CA, USA). Mutagenicity was assayed by the pre-incubation procedure proposed by Maron and Ames (1983) and revised by Mortelman and Zeiger (2000), modified for the analysis of increasing amounts of liquid sample (100, 200, 500, 1000 and 2000 µL) (Vargas *et al.*, 1995) exposed to a standard number of bacteria (1 – 2 X 10⁸ cells/mL) in the presence and absence of metabolic activation.

The Mutagenic Index (MI) was calculated as the number of his+ per plate divided by the number of his+ per plate in the negative control. The final criteria used to interpret and consider the *Salmonella*/microsome assay as positive results

was the same used by Vargas *et al.* (1995): the number of revertants is double the spontaneous rate ($MI \geq 2$), a significant variance analysis ($p<0.05$) and a significant reproducible dose-response curve ($p<0.05$). Citotoxicity was inferred to those samples that show a revertant rate 60% below that of the spontaneous rate in two consecutive doses.

The SALMONEL program described in Myers *et al.* (1991) evaluated the variance analysis and the dose-response curves. This software predicts that the dose – response relationship of these assays can fit at least four regression models: CONSTANT $v = b$; LINEAR $v = bx + a$, LINTOX1 (linear attenuated by simple exponential toxicity) $v = (bx + a)_1^{-Tx}$; LINTOX2 (linear attenuated by exponential toxicity to the second power) $y=(ax + b)_2^{Tx}$. The software also considers the Bernstein model (Bernstein *et al.*, 1982), which consists of removing one or more doses from the analysis, using only results compatible with the linear model.

2.4. Animals - *In situ* exposure

L. fortunei individuals were collected in the contaminated sites Guaíba BR and Guaíba PC and in the control site, Itapuã State Park conservation area (RS, Brazil), which is an uncontaminated area protected by the environmental department of the state government (SEMA/ RS, 2006). Animals were immediately transported to the laboratory. The genotoxic assays, Comet Assay and Micronucleus Test, were performed using haemolymph cells of the mussels. The haemolymph was collected in the posterior adductor muscle with a hypodermic needle while the mussels were still alive, and the animals were killed immediately after collection, 16 individuals were analyzed in pools of 4 to enhance cell concentration in order to simplify the visual scoring for each exposure dose and control group of each assay. Positive control was performed with UVC radiation 4.5 J/m² for SCGA and pentachlorophenol 150 ppb for MN (Villela *et al.*, 2006).

2.5. Animals - Laboratory exposure

L. fortunei individuals were collected in the control site, Itapuã State Park preservation area. As described in Villela *et al.* (2006) approximately 250 individuals were collected, and immediately transported to the laboratory. About 80 animals were placed in each of three aquaria containing 2 L of water from the collection site, Guaíba PC and Guaíba BR, and kept under constant aeration at 22 ± 2°C. Animals were fed every two days with feed for herbivorous fish, prepared by previously blending it with water. Experiments started after an adaptation period from 7 to 20 days. For each sampling site and in each sampling period about 80 individuals were kept for 7 days in aquaria containing 2 ± 0.1 L of water sample plus 100 ± 5 g of sediment sample. Every 24 h, ¼ of the total volume of water and sediment was changed. Mollusks kept in water and sediment from Itapuã were used as negative controls. Animals were not fed during exposure. Haemolymph collection was made as previously described, and comet assay and micronucleus test performed. Positive control was performed as previously described.

2.6. Comet assay

The SCGA was performed as described in Villela *et al.* (2006) using alkaline buffer pH12.1, 20 min for unwinding, electrophoresis 15 min 0.8 V/cm and staining with silver nitrate. Each replicate consisted of a pool of 4 individuals, and 4 replicates were prepared per concentration. From each replicate 100 cells were randomly chosen (50 from each duplicate slide), and analyzed under light microscope. For damage index calculation, cells were divided into four classes, according to tail size. The damage index (DI) is the sum of classes of the 100 cells analyzed, and may vary from 0 (all cells undamaged – 0 X 100) to 400 (all cells damaged – 4 X 100). The damage index is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail, and is considered a sensitive measure of detectable DNA damage. The damage frequency (DF) was calculated as the percentage of cells with a tail. Results were analyzed statistically using variance

analysis (ANOVA) with Dunnett's or Tukey's multiple comparisons.

2.7. The micronucleus test

The MN test was carried out as described in Villela *et al.* (2006), cells were fixed with sodium citrate (1%) and with formalin (4%). One thousand cells with complete cytoplasm were analyzed in each slide, and the presence or absence of MN was recorded. Each slide was produced from a pool of 4 individuals, and 4 slides were prepared per concentration. MN tests were identified according to the following criteria: spherical cytoplasmic inclusions with a defined contour, diameter smaller than approximately 1/3 of the main nucleus, color and texture similar to the nucleus, and absence of contact with the nucleus. Results were statistically analyzed using variance analysis (ANOVA) with Dunnett's or Tukey's multiple comparisons.

2.8. Particle-Induced X-ray Emission

Inorganic element content in the samples was analyzed by PIXE (Particle-Induced X-ray Emission) due to its high sensitivity, simplicity and ability to detect several elements simultaneously (Johansson *et al.*, 1995). Mussels' entire body, excluding the shells, samples were completely dried at 60°C for 24h, ground into a fine powder, and then pressed into thick pellets which were placed in the PIXE target-holder inside a reaction chamber with a pressure of about 10-5 mbar. The PIXE analyses were carried out at the Ion Implantation Laboratory of the Physics Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul using a 3.0 MV Tandemron accelerator delivering a 2.0 MeV proton beam with an average current of about 1 nA at the target. The X-rays produced in the target were detected by a Si(Li) detector with an energy resolution of 155 eV at 5.9 keV. The data acquisition system was optimized to allow X-rays energies up to 15 keV. The spectra were analyzed with the GUPIX code (Campbell *et al.*, 2000) developed at the University of Guelph (Canada).

3. Results

*3.1. Mutagenic response - *Salmonella*/microsome assay*

The *Salmonella*/microsome assay strains TA100 and TA98, the strains most widely used in water analysis, were used to evaluate surface water samples from the Guaíba Lake (Table 1). Only one positive result was found for the TA98 strain, which detects frame-shift error type, in the presence of metabolic activation for the winter sample of the Guaíba BR. Toxicity was found in Guaíba PC in the summer sample with TA98 in the absence of metabolic activation.

Mutagenicity of sediment interstitial water samples collected in winter and summer were analyzed by using four strains, TA98, TA100, TA97a and TA102. As shown in Table 2, no positive mutagenicity response was found. However, toxic response was found for Guaíba BR sampling site with TA100 in the absence of metabolic activation.

Table 1: Mutagenic evaluation of surface water samples from the Guaíba river basin by *Salmonella*/microsome assay in TA 98 and TA100 strains, with and without metabolic activation.

Site ^a	Dose	Summer						Winter					
		TA98			TA98 S9			TA98			TA98 S9		
µl/p ^b	his+/p ^c	SD ^d	MI ^e	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	
GPC	0 ^f	18.33	7.51	-	31.00	1.00	-	25.00	3.00	-	48.60	32.58	-
	100	16.00	3.00	0.87	21.00	4.36	0.67	28.66	14.22	1.14	51.30	12.66	1.06
	200	17.50	2.12	0.95	32.00	9.9	1.03	18.00	6.24	0.75	50.50	3.54	1.04
	500	21.00	5.57	1.14	24.00	3.0	0.77	13.33	1.53	0.53	57.60	5.86	1.19
	1000	10.00	6.93	0.54T	25.00	5.0	0.80	15.33	4.93	0.61	38.30	8.96	0.79
	2000	8.00	3.00	0.44 T	24.33	2.31	0.78	24.33	7.77	0.97	49.60	9.81	1.02
GBR	0	12.33	2.52	-	31.33	2.08	-	20.66	4.37	-	41.00	11.68	-
	100	13.00	5.20	1.05	27.66	6.66	0.88	16.50	2.12	0.79	56.00	16.50	1.37
	200	12.00	3.46	0.97	37.66	1.15	1.20	16.00	11.36	0.77	119.00	35.50	2.90 +
	500	11.66	2.08	1.02	22.00	2.00	0.70	16.66	4.16	0.80	38.00	12.12	0.93
	1000	12.00	2.65	0.97	23.33	8.02	0.74	13.33	2.08	0.64	44.00	19.22	1.07
	2000	6.66	1.15	0.54	27.66	9.81	0.88	12.00	4.36	0.58	28.00	9.45	0.68
Site	Dose	TA100			TA100 S9			TA100			TA100 S9		
	µl/p	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI
GPC	0	103.00	3.61	-	120.33	11.15	-	148.00	12.29	-	227.66	18.34	-
	100	112.00	8.72	1.08	106.33	8.33	0.88	160.00	6.93	1.08	246.66	6.51	1.08
	200	114.00	11.8	1.10	120.30	7.37	1.00	162.33	4.04	1.09	272.66	54.22	1.19
	500	97.00	6.56	0.94	104.66	10.7	0.86	139.66	10.02	0.94	235.00	14.11	1.03
	1000	102.66	16.6	0.99	107.66	2.08	0.89	149.66	15.28	1.01	184.33	22.37	0.80
	2000	98.00	4.36	0.95	88.66	16.2	0.73	166.66	16.01	1.12	196.33	28.57	0.86
GBR	0	84.00	19.97	-	73.00	9.54	-	177.66	14.47	-	224.66	19.43	-
	100	84.33	8.08	1.04	92.66	9.50	1.26	161.00	1.00	0.90	208.66	9.61	0.90
	200	95.33	1.15	1.20	90.00	14.4	1.23	165.66	9.71	0.93	288.33	72.75	1.28
	500	79.33	14.6	0.97	81.33	3.79	1.11	153.00	5.00	0.86	218.00	2.65	0.97
	1000	78.33	4.16	0.96	103.66	18.6	1.42	162.00	10.58	0.91	256.66	45.65	1.14
	2000	81.00	4.00	1.00	59.66	15.5	0.81	142.33	8.50	0.80	277.33	23.71	1.23

^a Sampling site: GPC - Guaíba Ponta da cadeia and GBR - Guaíba BR; ^b µl of sample per plate;

^c Revertants (his+) per plate, mean of three independent plates; ^d Standard derivation; ^e Mutagenic index = his+ per plate/ his+ per plate negative control.; ^fNegative control 100µl sterile distilled water; + Positive, T- Toxic.

TA 100 - Positive control: sodium azide 5g/plate: 924 -850; aflatoxin B1 5g/plate: 698-400; TA 98 - Positive control: 4-oxide-1nitroquinoline 5g/plate: 200 - 212; aflatoxin B1 5g/plate: 230-250.

Table 2: Mutagenic evaluation of interstitial water samples from the Guaíba basin by *Salmonella*/microsoma assay in TA 97a, TA 98, TA100 and TA102 strains, with and without metabolic activation.

Site ^a	Dose	Winter						Summer						
		TA98			TA98 S9			TA98			TA98 S9			
		μl/p ^b	his+/p ^c	SD ^d	MI ^e	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI
GPC	0 ^f	22.33	5.86	-		24.67	1.15	-	22.33	5.86	-	43.67	8.50	-
	100	21.67	7.57	0.97		24.67	3.06	1.00	20.33	4.62	0.91	24.33	1.15	0.55
	200	18.67	2.08	0.83		34.67	9.45	1.40	19.00	7.00	0.85	34.67	12.66	0.79
	500	12.67	4.93	0.56		22.67	4.73	0.91	14.33	3.21	0.64	30.00	5.29	0.69
	1000	14.67	2.08	0.65		18.00	3.46	0.72	17.00	2.65	0.76	23.00	10.82	0.53
	2000	11.00	1.00	0.49		18.00	9.64	0.72	12.67	4.04	0.56	31.00	10.15	0.71
GBR	0	22.33	5.86	-		24.67	1.15	-	22.33	5.86	-	43.67	8.50	-
	100	18.33	4.93	0.82		29.33	2.31	1.18	15.67	8.08	0.70	64.00	48.08	0.89
	200	23.00	8.19	1.03		40.67	5.86	1.64	16.33	7.09	0.73	31.67	20.82	0.72
	500	17.00	4.58	0.76		25.33	7.23	1.02	17.00	6.24	0.76	45.00	30.41	1.03
	1000	22.00	4.58	0.98		21.50	2.12	0.87	19.33	6.11	0.86	35.33	13.58	0.81
	2000	16.00	5.20	0.71		23.67	7.37	0.95	18.33	3.21	0.82	46.50	19.09	1.07
Site	Dose	TA100			TA100 S9			TA100			TA100 S9			
	μl/p	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	
	GPC	0	144.00	12.53	-	176.67	26.10	-	144.00	12.53	-	176.67	26.10	-
	100	138.00	4.00	0.95		164.00	13.00	0.93	141.00	22.91	0.97	167.33	38.80	0.95
	200	120.33	14.01	0.83		143.00	40.51	0.81	154.33	9.61	1.07	162.67	17.47	0.92
	500	136.67	13.61	0.94		125.33	27.15	0.71	109.67	7.23	0.76	130.00	7.00	0.74
GBR	1000	126.33	19.86	0.87		135.00	7.00	0.76	125.67	19.14	0.87	127.67	18.77	0.72
	2000	92.67	12.22	0.64		153.67	7.37	0.87	94.33	6.81	0.65	144.00	22.27	0.81
	0	144.00	12.53	-		176.67	26.10	-	144.00	12.53	-	176.67	26.10	-
	100	154.33	36.83	1.07		153.00	30.81	0.86	141.67	9.07	0.98	155.33	39.11	0.87
	200	119.33	27.30	0.82		135.33	8.08	0.76	147.33	17.01	1.02	126.67	15.57	0.72
	500	110.33	4.73	0.76		116.33	19.86	0.65	152.00	14.00	1.05	112.67	25.01	0.64
T	1000	83.67	11.85	0.58		97.67	13.86	0.55	137.00	15.52	0.95	107.33	3.06	0.61
	2000	77.00	1.41	0.53	T	157.33	17.04	0.89	95.33	11.72	0.66	147.33	20.53	0.83

Cont. Table 2:

Site ^a	Dose	Winter						Summer						
		TA97a			TA97a S9			TA97a			TA97a S9			
		μl/p ^b	his+/p ^c	SD ^d	MI ^e	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI
GPC	0 ^f	240.67	2.31	-		152.67	30.09	-	176.67	3.21	-	188.00	3.46	-
	100	254.00	28.83	1.06		178.67	16.65	1.17	176.00	16.09	0.99	149.33	10.07	0.79
	200	298.33	14.15	1.24		163.00	9.90	1.07	211.33	57.74	1.20	159.00	15.56	0.84
	500	277.67	33.56	1.15		131.33	3.06	0.84	172.33	22.50	0.97	125.00	25.51	0.66
	1000	216.67	17.10	0.90		160.00	12.00	1.05	179.33	29.70	1.02	95.00	0.00	0.50
	2000	174.00	9.64	0.72		215.50	10.61	1.41	120.67	16.01	0.68	131.33	5.69	0.69
GBR	0	176.67	3.21	-		152.67	30.09	-	240.67	2.31	-	188.00	3.46	-
	100	165.67	12.66	0.94		183.33	18.58	1.20	191.33	14.50	1.20	175.50	10.61	0.93
	200	232.33	24.79	1.32		153.00	32.08	1.06	182.33	27.47	1.15	141.00	28.16	0.75
	500	178.00	10.44	1.00		153.00	21.21	1.00	151.67	16.29	0.95	162.00	2.83	0.86
	1000	174.00	21.63	0.98		143.00	7.94	0.94	152.00	23.64	0.96	158.00	5.66	0.84
	2000	128.33	13.01	0.73		173.33	64.26	1.13	123.33	12.50	0.77	169.33	11.02	0.90
Site	Dose	TA102			TA102 S9			TA102			TA102 S9			
		μl/p	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI	his+/p	SD	MI
	GPC	0	181.67	30.04	-	608.67	80.11	-	370.33	54.63	-	608.67	80.11	-
	100	146.00	68.79	0.80		666.00	25.46	1.09	371.67	6.81	1.00	554.67	51.00	0.91
	200	135.00	26.85	0.74		502.67	64.17	0.82	450.67	91.77	1.22	540.00	141.4	0.88
	500	186.00	7.00	1.02		573.33	49.00	0.94	462.00	17.44	1.25	511.00	4.24	0.84
GBR	1000	156.00	31.61	0.85		457.00	18.38	0.75	570.67	133.0	1.54	584.00	20.78	0.96
	2000	133.33	30.44	0.73		472.00	62.45	0.77	429.33	63.29	1.16	568.00	22.63	0.93
	0	356.00	49.67	-		608.67	80.11	-	370.33	54.63	-	608.67	80.11	-
	100	310.00	78.62	0.87		617.33	49.81	1.01	555.33	57.77	1.49	703.00	18.38	1.15
	200	296.33	41.10	0.83		456.00	101.8	0.75	601.00	95.00	1.62	461.00	15.00	0.75
	500	242.67	8.33	0.68		387.00	4.24	0.64	604.00	34.87	1.63	489.33	57.14	0.80
	1000	267.00	7.00	0.75		636.67	311.9	0.77	504.00	46.13	1.36	525.00	89.10	0.86
	2000	200.00	5.29	0.56		463.00	35.36	0.76	544.00	58.92	1.47	606.00	74.00	0.99

^a Sampling site: GPC - Guaíba Ponta da cadeia and GBR - Guaíba BR; ^b μl of sample per plate; ^c Revertants (his+) per plate, mean of three independent plates; ^d Standard derivation; ^e Mutagenic index = his+ per plate/ his+ per plate negative control.; ^fNegative control 100μl sterile distilled water; + Positive, T- Toxic.

TA97a - Positive control: 4-oxide-1nitroquinoline 5g/plate: 607 - 797; aflatoxin B1 5g/plate: 702 - 882. TA 102 - Positive control: 4-oxide-1nitroquinoline 5g/plate: 2702 - 6974; aflatoxin B1 5g/plate: 1276.

3.2. Genotoxic / Mutagenic response - Biomonitoring with *Limnoperna fortunei*

The analysis of *Limnoperna fortunei* individuals exposed *in situ* and in laboratory conditions showed an increase in DNA damage by SCGA in Guaíba BR exposed mussels, as compared to the control site Itapuã (Table 3). Laboratory exposure seems to induce higher damage values by the SCGA, comparing to the *in situ* exposure. In a statistical comparison of both exposures (laboratory and *in situ*), only the Damage Index (DI) of the Guaíba BR showed significant differences ($p>0.01$), with higher values in the laboratory exposure. However, this difference did not influence the results, once Guaíba BR induced genotoxicity in both exposures.

Also in Table 3, by sampling *Limnoperna fortunei* individuals exposed *in situ*, comparing to the control site (Itapuã), an increase in MN was found induced by both Guaíba samples (Guaíba PC and Guaíba BR). However, in the laboratory exposure only Guaíba PC increased significantly the MN frequency.

Table 3: Detection of DNA damage by the comet assay and micronuclei frequency in haemolymph cells of *Limnoperna fortunei* individuals exposed *in situ* and in laboratory to environmental samples from the Guaíba river basin.

Site	in situ			laboratory		
	DI ^a	DF ^b	MN ^c	DI	DF	MN
Itapuã	32.80±9.34	12.80±3.52	3.00±0.82	49.78±29.39	17.46±10.40	3.30±0.60
Guaíba BR	53.86±27.49*	18.71±9.52	5.75±1.26*	109.50±17.09** [#]	36.50±7.57*	4.30±0.60
Guaíba PC	29.83±13.23	9.67±4.23	5.33±0.58**	66.77±31.88	23.38±11.78	5.30±0.60*

^a Damage Index (DI) - 0= no damage, 400= maximum damage; ^b Damage Frequency 0%= no damage; 100%= maximum damage, both expressed as mean ± S.D values obtained from an average of 100 cells per pool; ^c Number of micronuclei are mean ± S.D value obtained from an average of 1000 cells per pool. In each group: n=16 / 4 animals per pool, 4 pools per group. Significant at * $P< 0.05$, ** $P< 0.01$; in all cases significance was tested with respect to 0 (control) using ANOVA and Dunnet's test. Significant at [#] $P< 0.01$, in relation to the DI Guaíba BR *in situ* result ANOVA and Tukey's test. Positive control, SCGA - UVC radiation 4.5 J/m², DI= 103 - 300 and DF= 34 - 81%; MN - pentachlorophenol 150 ppb 14 - 18 MN/1000 cells.

3.3. Inorganic Elements Content response - PIXE

Inorganic elements detected by PIXE in surface water samples are shown in Figure 2. An increase in the concentration of all elements was found from the summer to the winter sampling. However, as shown in figure, in both seasons no significant differences were found between Guaíba BR and Guaíba PC inorganic elements concentration.

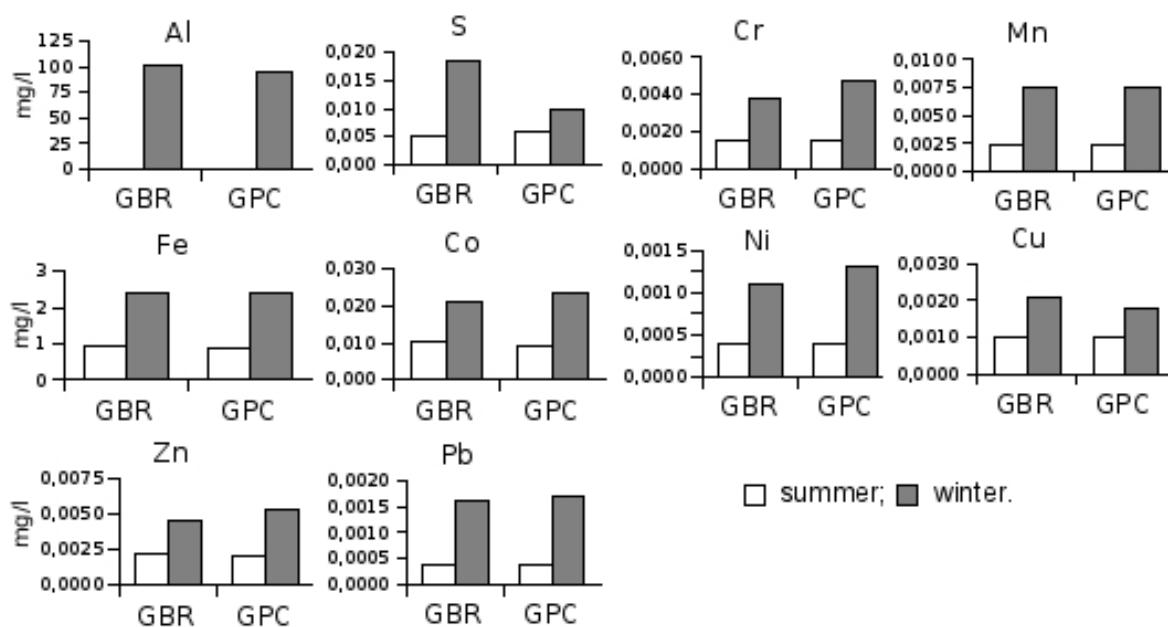


Figure 2: Inorganic elements of surface water samples from the Guaíba river basin by PIXE. Results expressed in mg/l of water.

An analysis of the mussel body by PIXE found 14 different elements, shown in Figure 3. Most of the elements are present in slightly larger quantities in the *in situ* exposure. Itapuã samples showed Chromium and Bromine only in laboratory exposed animals, the same was found with Guaíba BR for Chromium, Rubidium and Lead and for Guaíba PC for Rubidium and Lead. Strontium was present only *in situ* in the Guaíba BR samples.

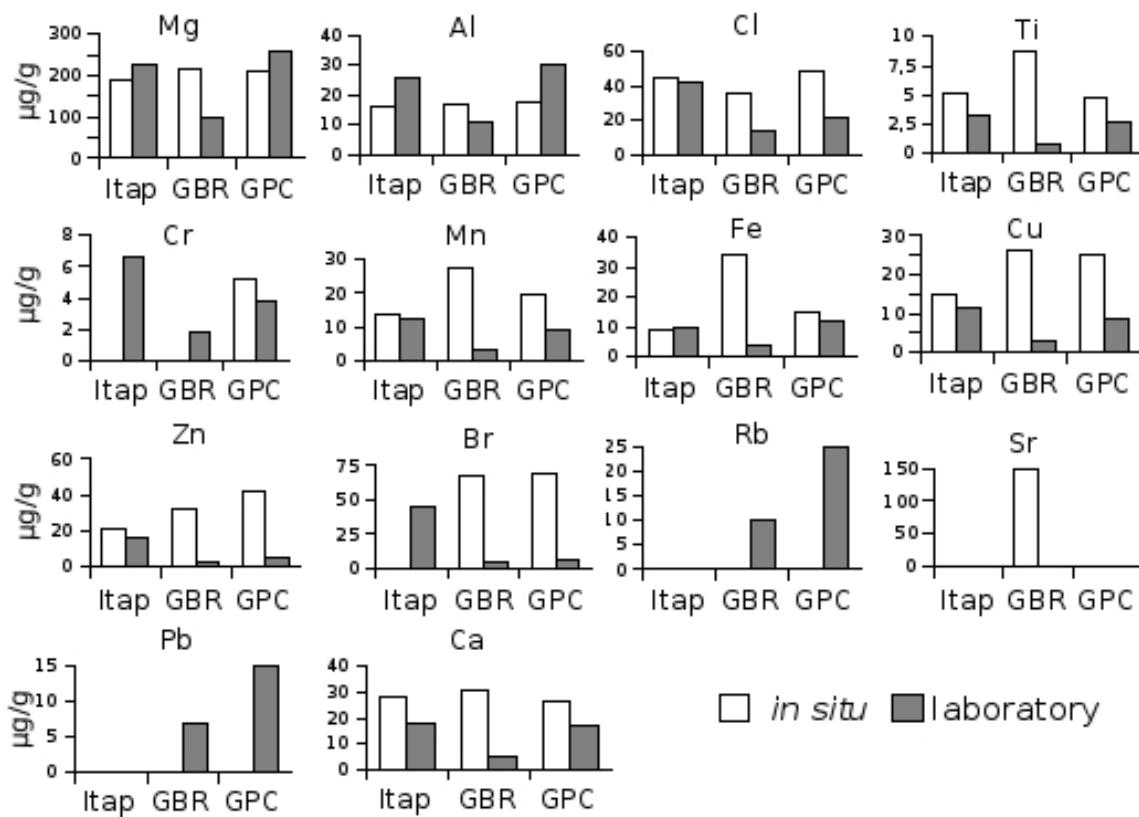


Figure 3: Inorganic elements in the body of *L. fortunei* individuals exposed *in situ* and in laboratory to environmental samples from the Guaíba river basin sampled in the Summer by PIXE.

Correlating the data from the sampling sites (Itapuã, Guaíba BR and Guaíba PC) together, MN results from the *in situ* exposure are related with Copper (Pearson's correlation coefficient 0.999 p<0.05). MN was also correlated in laboratory exposure samples with Lead (Pearson's correlation coefficient 1.00 p<0.01). Correlating all sampling sites and exposures (*in situ* and laboratory) together, Rubidium is also related with MN (Pearson's correlation coefficient 1.00 p<0.01). No correlation was found with SCGA results.

4. Discussion

The genotoxic/mutagenic potential of surface water and sediments has been widely studied (Ohe *et al.*, 2004; Chen and White, 2004). In both cases, the *Salmonella*/Microsome assay is the most widely used test. Most of the results

described in the literature are from extracts from both compartments, but direct filtrated water and interstitial water were also used. The small quantities, of these contaminants in environmental samples are the reason for the use of specific concentration methods. However, these methods can result in the loss of some contaminants (Vargas et al., 1995), for this reason a first direct assay seems to be interesting. Toxic response was detected in the Guaíba PC sampling site in the summer sample. Only one positive mutagenic result (winter) was found in our analysis induced by the Guaíba BR sampling site. Metal contained in water samples were higher in the winter, possibly related with bioavailability and resulting in the positive response in this season. It is known that pH variations can influence metal bioavailability (Beyer et al., 1996). However, in our study pH remains stable in the sampling seasons and sites, ranging from 6.63 to 6.73 in the Guaíba BR samples and from 6.63 to 6.86 in the Guaíba PC samples. This small variation could not have influenced metal availability. The presence of slightly higher quantities of Sulfur and Copper, in the Guaíba BR than in the Guaíba PC, in the winter, also can be related with the mutagenic induction observed. These elements were already described as mutagenic; Sulfur by Yi and Meng (2003) and Copper by Villela et al. (2006). Additionally, synergistic and antagonistic effects can also be expected from inorganic and organic contaminants, leading to different unpredicted biological effects (Donnelly et al., 2004; Azevedo and Chasin, 2004).

Chen and White (2004) have suggested that sediments can act as a reservoir of toxic contaminants that continually threaten the health and viability of aquatic biota. This compartment is in constant change with the water, receiving and reintroducing these contaminants. The interstitial water samples failed in inducing mutagenicity, it only induced one toxic response. Regarding this subject, Cardozo et al. (2006) also found toxicity in the environmental samples contaminated by urban waste discharges from two streams located near the Guaíba Lake.

The high damage index (DI) values found in the laboratory exposure by SCGA were compared with the *in situ* results. Statistically significant differences between the two exposures DI were found only in the Guaíba BR sampling site results. This

trend has not influenced the genotoxic response, in both exposures only Guaíba BR shows a significant damage increase. The variation found could be caused by stress in laboratory conditions, related with transport, glass aquaria, etc, that can increase DNA damage background. Differences inherent in mussels' population, as toxic response adaptation for example, can also influence this response. Studying wild (animals exposed during all life in a contaminated site) versus caged (transported from a control site to a contaminated one) mussels Bolognesi *et al.* (2004) also found that caged mussels showed higher levels of DNA damage than wild mussels, suggesting this event is the result of recent exposure. Organisms may acclimatize physiologically at the individual level and could become more resistant as a consequence of earlier exposure. This phenotypic plasticity may modify the toxic effects of exposure to contaminants in the natural biota (Jha, 2004).

Comparing MN results in both exposures (laboratory and *in situ*) no statistically significant variations were detected. The only difference found was the non-significant increase in MN frequency in Guaíba BR in laboratory conditions, which was significant *in situ*. A slight trend towards an increase appears, suggesting that with exposure times longer than the 7 days of laboratory exposure the induction should probably be significant, as found in the *in situ* exposure. Bolognesi *et al.* (2004) suggest that wild mussels accumulated significant concentrations of chemicals and showed a higher induction of chromosomal damage than caged mussels, which can be expressed as micronuclei frequency. In fact, both exposures present very useful and reliable results.

Copper, Lead and Rubidium present in mussels seem to be statistically related with MN results. The relation between Copper and mutagenicity is in accordance with the already described for our surface water results. Lead is a potent DNA interactor (Johnson, 1998), whereas no clear relation between rubidium and genotoxicity is described in literature.

A very important point to be considered when discussing metal presence in mussels is the interaction of inorganic elements in biological organisms. Shi and

Wang (2004) suggest that influences of a previous exposure to one element on the bioaccumulation of other elements were specific due to the differential binding and toxicity. This kind of interaction might have influenced the absorption of inorganic elements by *Limnoperna fortunei* individuals. It can be suggested that the absorption of mussels *in situ* was compromised by the presence of other elements. Following this idea is important to consider the higher Calcium values *in situ*, when comparing to laboratory exposure. Studying juvenile rainbow trout, Franklin *et al.* (2005), suggested that Ca and Cd share common pathway(s)/transport mechanism(s) and that nutrient metals other than Ca may also influence Cd (and other metal) uptake. In fact, Ca competes with elements that presents similar size and charge. When mussels from the control site were exposed in laboratory conditions this influence could be reduced and some metals could possibly be more easily absorbed, as it seems to be the case with Pb and Rb. Potassium (not analyzed in this study) can also influence in other elements absorption, being interesting to be investigated.

Analyzing historical data from these sites (Table 4), a stronger urban impact was found in the Guaíba PC in relation to the Guaíba BR sampling site. The low dissolved oxygen (DO) and high biochemical oxygen demand (BOD), organic and ammoniunitrogen and *Escherichia coli* contents found for this sampling site can be directly related with urban sewage discharges. Despite the inorganic influence, organic contaminants probably account for most of the genotoxicity induction in this basin, as widely discussed in the literature. Studying industrial effluents, White *et al.* (1996) and Houk (1992) observed highest genotoxic potential in waste waters from industrial organic chemicals facilities. The study by White *et al.* (1996) also showed that organic extracts from municipal effluents are less genotoxic than those from industrial sources. It is very important to consider the volumetric emission rates of these facilities, because despite the significant genotoxic potential of industrial contaminants, the quantity discharged is low when compared to municipal waste water (White *et al.*, 1998). In the Guaíba lake basin, 960,000 m³ of sewage is discharged into this basin on a daily basis, compared to 890 m³ of industrial discharges and 16,500 L of agrochemicals (Pró-Guaíba, 2006). This

urban waste effects on the Guaíba lake basin were also described by Villela *et al.* (submitted), showing that the region impacted by urban wastes presented the majority of the positive results with SCGA and MN in *L. fortunei* comparing to regions impacted mostly by industrial and rural contaminants. In this study, it was also difficult to correlate the genotoxic responses and the presence of inorganic elements, but was possible to observe that the goldem mussel seems to be more sensitive to urban contaminants. Studying the Dilúvio stream that flows to the Guaíba Lake very near our sampling sites (Guaíba BR and Guaíba PC), Prá *et al.* (2005) have found a strong relationship between the mutagenic potential and urbanization. Cardozo *et al.* (2006) have also studied water samples collected near the Guaíba Lake, finding genotoxic induction, by MN in V79 cells and indirect frameshift by Ames micro-suspension test induced by water organic extracts in heavily urbanized areas.

Table 4: Historical physical-chemical mean values from the Guaíba lake.

	Chlor. ^a mgCl.L ⁻¹	DO ^b mgO ₂ L ⁻¹	BOD ^c mgO ₂ L ⁻¹	NH3 ^d mg NL ⁻¹	PO4 ^e mg PL ⁻¹	E. coli NMP.100ml ⁻¹	NO3 ^f mg NL ⁻¹
Itapuã	5.90	7.30	3.80	1.00	0.10	650	1.30
GuaíbaBR	8.30	4.60	2.40	2.35	0.18	16000	0.58
GuaíbaPC	28.90	0.10	28.00	8.37	1.32	580000	0.91

Source: CONCREMAD, 2005; ^a Chlorides; ^b Dissolved oxygen; ^c Biological oxygen demand; ^d Ammonia nitrogen; ^e Phosphate; ^f Nitrite.

These results will support the discussion on the issue of urban organic pollution in the Guaíba Lake and emphasize the importance of using different bioassays to help understand the biological relevance of contamination sources. The use of specific extraction and more sensitive *in vitro* procedures is strongly recommended to improve the understanding of contaminants distribution and effects. However, it can be suggested that sewage treatment seems to be one of the most important measures to preserve this ecosystem and improve the quality of the water to the public water supply.

Acknowledgments

The authors would like to thank COPESUL, GENOTOX -UFRGS, CAPES, CNPq and FAPERGS for having supported the research, and to the Preservation Unit Division (Divisão de Unidades de Conservação) from the environmental department of the state government (SEMA-RS) for having allowed sampling at the Itapuã State Park (RS, Brazil).

References

- Amaral, V.S., Medina-Silva, R., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2005a. Drosophila wing spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat. Res.* 583, 67-74.
- Amaral, V.S., Sinigaglia, M., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2005b. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the Drosophila Wing-Spot Test. *Env. Pollut.* 139 (3), 469-73.
- Azevedo, F.A., Chasin, A.A.M., 2004. As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia. Rima, São Carlos and Intertox, São Paulo.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97, 267- 281.
- Beyer, W.N., Heinz, G.H., Redmon-Norwood, A.W., 1996. Environmental Contaminants in Wildlife. SETAC, Clemson and Lewis Publishers, Boca Raton.
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D.N., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implication for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.* 463, 33–51.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., Viarengo, A., 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies, *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 287-292.
- Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Monteverde, M., Poli, P., Rossi, C., 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated

with three different disinfectants. *Sci. Tot. Environ.* 333 (1-3), 127 - 36.

Campbell, J.L., Hopman, T.L., Maxwell, J.A., Nejedly, Z., 2000. The Guelph PIXE software package III: alternativa proton database.. *Nucl. Instrum. and Meth in Phys. Res. B.* 170, 193 - 204.

Cardozo, T.R., Rosa, D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., Oliveira, N.C.D'A., Pereira, T.S., Pastoriza, T.F., Marques, D.M., Lemos, C.T., Terra, N.R., Vargas, V.M.F., 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutat. Res.* 603, 83 - 96.

Chen, C., White, P.A., 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat. Res.* 567, 151 - 225.

Donnelly, K.C., Lingenfelter, R., Cizmas, L., Falahatpisheh, M.H., Qian, Y., Tang, Y., Garcia, S., Ramos, K., Tiffany-Castiglioni, E., Mumtaz, M.M., 2004. Toxicity assessment of complex mixtures remains a goal. *Environ. Toxic. Pharmac.* 8 (2), 135 - 141.

Franklin, N.M., Glover, C.M., Wood, C.M., 2005. Calcium/cadmium interactions at uptake surfaces in rainbow trout: waterborne versus dietary routes of exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (11), 2954 – 64.

Guimmler-Luz, M.C., Erdtmann, B., Balbueno, R.A., 1992. Analysis of clastogenic effec of Porto Alegre drinking water supplies on mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.* 279, 227 – 231.

Houk, V.D., 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 277, 91-138.

Jha, A.N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res.* 552, 1 - 17.

Johnson, F.M., 1998. The genetic effects of environemntal lead. *Mutat. Res.* 410, 123 - 140.

Kennedy, V.J., Augusthy, A., Varier,K.M., Magudapathy,P., Panchapakesan,S., Ramesh,C., Nair, K.G.M., Vijayan, V., 1998. PIXE analysis of trace pollutants in Chaliyar river water in Malabar, India. *Nucl. Instrum. and Meth in Phys. Res. B.* 134, 224 – 228.

Kennedy, V.J., Augusthy, A., Varier, K.M., Magudapathy, P., Panchapakesan, S., Ramesh, C., Vijayan, V., Nair, K.G.M., 1999. Trace metal distribution studies in river water by PIXE. *Nucl. Instrum. and Meth in Phys. Res. B.* 150, 277 – 281.

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.

Lemos, C.T., Vargas, V.M.F., Henriques, J.A.P., Mattevi, M.S., 1994. Genotoxicity of river water under the influence of petrochemical industrial complexes. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52, 848 – 855.

Lemos, C.T., Erdtmann, B., 2000. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. Mutat. Res. 467, 1-9.

Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat. Res. 113, 173 – 251.

Mersch, J., Beauvais, M.N., Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutat. Res. 371, 47-55.

Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutat. Res. 455, 29 – 60.

Myers, L.N., Adams, L., Kier, T.K., Rao, B., Shaw, B., Willians, L., 1991. Microcomputer software for data management and statistical analyses of the Ames/*Salmonella* test, in: Krewski, D., 1991. Statistical methods in toxicological research. Gordon and Breach, New York.

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. Mutat. Res. 567, 109 - 149.

Pavlica. M., Klobucar, G.I.V.M., Mojas N., Erben R., Papes D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. Mutat. Res. 490, 209 – 214.

Pavlica, M., Klobucar, G.I.V.M., Vetma, N., Erben, R., Papes, D., 2000. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. Mutat. Res. 465, 145 – 150.

Prá, D., Lau, A.H., Knakievicz, T., Carneiro, F.R., Erdtmann, B., 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarian. Mutat. Res. 585 (1-2), 79 - 85.

Pró Guaíba, Programa para o Desenvolvimento Sócio Ambiental da Região Hidrográfica do Guaíba, 2006. web page <<http://www.proguiba.rs.gov.br>>.

Ralph, S., Petras, M., 1998. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. Mutat. Res. 413, 235-250.

Rolla, H.C., Henriques, J.A.P., 1996. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e Lodo proveniente da indústria de papel e celulose. O Papel. 11, 85 - 93.

Rolla, H.C., Henriques, J.A.P., 1997. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de lodo proveniente da indústria de papel e celulose. O Papel. 12, 95 - 99.

SEMA/ RS, Governo do Estado do Rio Grande do Sul; web page Secretaria Estadual do Meio Ambiente, 2006.
<http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/bioconh5.html> .

Shi, D., Wang, W-X., 2004. Modification of trace metal accumulation in the green mussel *Perna viridis* by exposure to Ag, Cu, and Zn. Environ. Pollut. 132, 265 - 277.

Silva, J., Freitas, T.R.O., Heuser, V., Marinho, J.R., Bittencourt, F., Cerski, C.T.S., Kliemann, L.M., Erdtmann, E., 2000. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. Mutat. Res. 470, 39-51.

Vargas, V.M.F., Guidobono, R.R., Jordão, C., Henriques, J.A.P., 1995 . Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. Mutat. Res. 343, 31-52.

Vargas, V.M.F., Migliavacca, S.B., Melo, A.C., Horn, R.C., Guidobono, R.R., Ferreira, I.C.F.S., Pestana, M.H.D., 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. Mutat. Res. 490, 141-158.

Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. Mutat. Res. 319, 31- 45.

Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P., 1988. Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames test (*Salmonella/microsome*). Revista Brasileira de Genética. 11 (3), 505-518.

Villela, I.V., Oliveira, I.M., Silva, J., Henriques, J.A.P., 2006. DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) Exposed to Environmental Contaminants. Mutat. Res. 697, 78-86.

Villela, I.V., Silva, J., Oliveira, I.M., Dias, J. F., Silveira, J. C., Henriques, J.A.P., Submitted. Assessment of environmental stress by the micronuclei and comet assay on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions.

Yi, H., Meng, Z., 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. Mutat. Res. 537, 109–114.

White, P.A., Rasmussen, J.B., Blaise, C., 1996. Sorption of organic genotoxins to particulate matter in industrial effluents. Environ. Mol. Mutagen. 27, 140 - 151.

White, P.A., Rasmussen, J.B., 1998. The genotoxic of domestic wastes in surface waters. Mutat. Res. 410, 223 – 238.

VI Discussão

A associação de efeitos a saúde relacionados com a exposição a poluentes ambientais é uma temática muito abordada. A simples detecção de contaminantes do ambiente por técnicas analíticas não é suficiente para compreender suas consequências, a menos que seus efeitos biológicos sejam apropriadamente avaliados. Somado a isto, genotoxinas podem ocorrer no ambiente como misturas complexas, e o risco associado a estas misturas não pode ser adequadamente antecipado com base no comportamento e efeito dos componentes individuais. O conhecimento sobre o efeito individual de substâncias químicas é extenso, enquanto dados definindo mecanismos de interação de misturas complexas são mais limitados (DONNELLY *et al.*, 2004). Como sistemas biológicos são o alvo da ação tóxica, eles podem fornecer informações importantes, não disponíveis em análises químicas de amostras ambientais. Devido à limitação do monitoramento químico, a importância do monitoramento biológico vem sendo amplamente reconhecida (JHA, 2004).

1 Padronização de um organismo para biomonitorar a Região Hidrográfica do Lago Guaíba.

A Região Hidrográfica do Lago Guaíba é muito estudada, sendo realizadas análises físico-químicas e diferentes tipos de bioensaios, que oferecem uma variedade de informações a respeito da contaminação genotoxicológica de região. Apesar da crescente preocupação com a presença de genotoxinas no ambiente aquático, existe uma falta de métodos adequadamente validados, que possam ser efetivamente utilizados para avaliar genotoxicidade e toxicidade associada em organismos aquáticos submetidos a condições ambientais relevantes (JHA, 2004). No entanto, o uso de biomonitores cronicamente expostos no ambiente possibilita uma melhor clareza na compreensão dos efeitos biológicos destes

contaminantes, permitindo inferir as rotas reais de exposição e as alterações no metabolismo e na eficiência de reparação do DNA. Desta forma, o mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei*) apresentou-se como um ótimo candidato para suprir esta necessidade na Região Hidrográfica do Guaíba. As características adaptativas, o modo de vida e o tamanho da população o tornaram um biomonitor potencial para a região, preenchendo as principais características de um organismo sentinelas descritas em SILVA *et al.* (2003). Dentre estas, foi possível destacar: a) por ser um organismo invasor, bem adaptado, amplamente distribuído e encontrado em abundância na Região do Guaíba; b) ocorre tanto em locais livres de poluição, quanto em locais onde são expostos a diversos contaminantes ambientais; c) é de fácil captura e manipulação; e d) pode ser encontrado nas diferentes estações do ano. Além de definir o biomonitor adequado, selecionar os biomarcadores que apresentem características como alta sensibilidade e rápido resultado são de grande importância para que providências em caso de risco sejam rapidamente tomadas. Assim, o ensaio cometa e o teste de micronúcleos foram selecionados para este estudo com base na experiência do nosso grupo de pesquisa e sabendo que ambos possuem as características anteriormente citadas. Somando-se a isto, os resultados encontrados utilizando o ensaio cometa e teste de micronúcleos em mexilhão dourado em relação a sensibilidade a sulfato de cobre e pentaclorofenol em VILLELA *et al.* (2006/ Capítulo 1) comprovaram a sensibilidade deste organismo a potenciais contaminantes ambientais, o que foi reforçado com os resultados obtidos para a amostra ambiental. Assim, foi possível sugerir que o biomonitor e os biomarcadores testados são eficientes ferramentas de avaliação da qualidade das águas da bacia do lago Guaíba, passando esta região a contar com um sistema de monitoramento validado para a rápida avaliação do perigo do impacto de contaminantes ambientais ao ecossistema e a saúde humana. A utilização de biomonitoramento, segundo ALLEN & MOORE (2004), é uma importante ferramenta para proteção do sistema aquático, podendo fornecer informações para o desenvolvimentos da legislação na região.

A integridade do DNA reflete o histórico recente de contaminação por

genotoxinas, considerando que os organismos vivem em ambientes aproximadamente constantes, com contaminação, dano ao DNA e reparo também constantes. Quando se detecta variação na integridade do DNA, esta é resultado de um desequilíbrio entre dano no DNA e reparo, sendo este desequilíbrio diferente entre as espécies. A sensibilidade espécie-específica ao potencial genotóxico de certos ambientes pode, em longo prazo, modificar a estrutura populacional das comunidades (BIHARI & FAFANDEL, 2004).

A utilização de diferentes metodologias, *in vitro* e *in vivo* é de grande importância para uma completa avaliação ambiental. O uso de sistemas *in vitro* em estudos ecotoxicológicos oferece uma oportunidade de possível extração de dados dos sistemas *in vitro* para *in vivo*, e informações sobre a resposta biológica em diferentes níveis de organização. O desenvolvimento de sistemas *in vivo* também é essencial para fornecer base científica, possibilitando a avaliação da atividade genotóxica em organismos ecologicamente relevantes (JHA, 2004). Desta forma, a padronização das metodologias de ensaio cometa e teste de micronúcleos para aplicação em células da hemolinfa do organismo *L. fortunei*, foi de grande importância para a realização do biomonitoramento em diferentes locais impactados na bacia do Guaíba. Estes métodos, além de fornecer ferramentas para uso regional na detecção de regiões “hot spot”, podem ser utilizados em diferentes regiões do mundo, especialmente no monitoramento de contaminação ambiental, principalmente por efluentes urbanos, devido a ampla distribuição desta espécie.

2 Contribuição dos rios: importância da contaminação por efluente urbano.

A compreensão da fonte de contaminação prioritária do lago Guaíba é de grande importância para a tomada de decisões no sentido de diminuição da contaminação e consequente melhora na qualidade da água. A Região Hidrográfica do Lago Guaíba é formada pela confluência de cinco grandes rios que formam o lago. Buscando compreender as principais fontes estressoras da região,

o organismo sentinela padronizado foi utilizado para avaliar a foz dos cinco rios e do arroio Dilúvio e dois pontos dentro do lago próximos a saída do arroio Dilúvio. Cada rio possui uma ocupação característica, que resulta em uma contaminação predominante diferente entre eles, incluindo influência urbana, rural e industrial. Algumas respostas positivas esparsas foram observadas possivelmente relacionadas com a extração de carvão no Jacuí e com a indústria alimentícia no Taquarí (Capítulo 2). Nenhuma indução de genotoxicidade pelas amostras dos rios Caí e Sinos pode ser observada, discordando de resultados da literatura que indicam ação mutagênica nesses rios. Contudo, é importante salientar que as amostras foram coletadas na região de foz desses rios, onde os contaminantes estão mais diluídos devido a distância dos locais de liberação e ao refluxo de água do delta do Jacuí. Desta forma, a concentração de poluentes com potencial genotóxico nesta região fica reduzida, dificultando a sua detecção.

No entanto, assim como outros autores, este estudo aponta para os efluentes urbanos como principal problema na região. Durante os 10 anos do programa Pró-Guaíba, muito já foi feito para diminuir esta fonte de contaminação, sendo construídas três novas estações de esgoto e diversas moradias foram ligadas a rede de tratamento. Contudo, ainda há muito a ser feito, pois apenas 30% dos 960.000 m³ de esgoto liberados por dia na bacia são tratados (PRÓ GUAÍBA, 2006). Esta necessidade se reflete claramente na grande quantidade de resultados positivos encontrados em locais próximos a liberações de esgoto urbano. Outros autores, como WHITE & RASMUSSEN (1998), já consideravam a contaminação urbana, especialmente de grandes cidades, especialmente preocupantes, devido a liberação de grande quantidade de contaminantes complexos derivados principalmente de atividades sanitárias e industriais. Anteriormente, o arroio Dilúvio já havia sido avaliado em toda a sua extensão, sendo detectada uma correlação entre o aumento de danos ao DNA em planárias expostas e o aumento na urbanização ao longo deste corpo de água (PRÁ *et al.*, 2005). Nesta mesma região, CARDOZO *et al.* (2006) encontraram atividade genotóxica em locais com altas taxas de urbanização.

Na relação entre substância químicas e efeito biológico, numerosos fatores são importantes, como as propriedades da molécula, a concentração, a via de exposição, o comportamento e o destino dos compostos, etc. Quando se trata de contaminantes ambientais, a situação torna-se mais complexa ainda, em razão de o ambiente estar entre o ponto de liberação e o ponto de contato e estando estes dois eventos separados no tempo e no espaço. Desta forma, a concentração em que o composto está disponível e consequentemente o efeito que irá causar está relacionado com o que acontece com o composto no ambiente antes do contato com o organismos. Uma vez liberada, uma substância química pode entrar na atmosfera, na litosfera, na hidrosfera ou na biosfera por diferentes mecanismos: sair da água por volatilização; ser transportado pelo ar e movimentar-se para a fase aquosa por dissolução; estar presente no solo e entrar na água por dessorção; estar na água e adsorver-se sobre partículas do sedimento; e por fim chegando saindo de qualquer dos compartimentos e sendo absorvido pela biosfera (organismos vivos). A disponibilidade de um toxicante a um organismo em um subcompartimento ambiental depende da quantidade liberada no ambiente, da quantidade que desapareceu nos depósitos e de fatores de dispersão, transporte e bioacumulação (AZEVEDO & CHASIN, 2004). Estes fatores tornam muito importante a avaliação de diferentes compartimentos ambientais. No caso de ambientes aquáticos, estes compartimentos seriam água superficial, sedimento e organismo vivo.

Assim, para melhor compreender o comportamento dos diferentes agentes ambientais, foram escolhidos os locais identificados como mais contaminados pelo biomonitoramento inicial, Guaíba PC e Guaíba BR (Capítulo 2), para a avaliação de outros compartimentos ambientais. Neste estudo, foi possível observar forte indução de genotoxicidade/ mutagenicidade no mexilhão dourado, no entanto, apenas um resultado mutagênico induzido por uma amostra de água superficial e nenhum pelo lixiviado do sedimento (Capítulo 3). É plausível sugerir que os contaminantes estejam disponíveis em pequenas quantidades nos compartimentos abióticos, mas estejam sendo acumulados no compartimento biótico, onde seus efeitos estão sendo notados. Outra possibilidade é que o

mexilhão dourado seja muito sensível a contaminantes de origem urbana, tornando o sistema *in vivo* mais sensível do que o sistema *in vitro* na detecção deste tipo de poluente. Desta forma, para avaliar mais profundamente os efeitos dos contaminantes presentes em água e sedimento seria interessante a realização de extrações e concentrações destas amostras, evitando os efeitos complexos da amostra total e permitindo analisar especificamente compostos de origem urbana perigosos de forma mais efetiva e concentrada. Estes métodos vem sendo amplamente aplicadas nesta região, fornecendo resultados muito interessantes. No Rio dos Sinos, extratos do sedimentos foram capazes de induzir genotoxicidades detectadas pelo teste de Microtriagem por Indução Lisogênica (VARGAS *et al.*, 2001). No lago Guaíba, ROLLA & HENRIQUES (1996 & 1997) encontraram indução genotóxica por extratos orgânicos do sedimento avaliada pelo ensaio *Salmonella*/microssoma.

É importante considerar que o compartimento biótico é o destino final dos contaminantes, sendo onde ocorrem os efeitos tóxicos e genotóxicos. Na transferência de contaminantes do meio externo para um organismo, as concentrações observadas podem ser muito superiores as do meio, sendo este evento denominado bioacumulação. Vários fatores influenciam a bioacumulação dos xenobióticos, como processos biológicos envolvendo ecologia alimentar, hábitos, fisiologia e bioquímica das espécies e composição quali-quantitativa de compostos químicos no ambiente (AZEVEDO & CHASIN, 2004).

Para compostos orgânicos, os processos de distribuição interna, biotransformação e eliminação, bem como sua partição química no meio, determinam o grau de bioacumulação no organismo. A bioacumulação de metais é um processo complexo, pelo fato de alguns metais apresentarem mecanismos de absorção e regulação das concentrações internas saturáveis e de alguns apresentarem papel essencial em várias etapas do metabolismo de organismos vivos (AZEVEDO & CHASIN, 2004). Ainda que os efeitos biológicos não sejam extremos e detectados rapidamente, os efeitos da bioacumulação a longo prazo devem ser pensados. Um destes efeitos é a formação de micronúcleos. Foi

possível observar uma maior indução na freqüência de micronúcleos em animais crônicamente expostos aos contaminantes ambientais (exposição *in situ*) quando comprados aos animais expostos por sete dias em condições de laboratório (Capítulo 3). A biomagnificação é outro destes efeitos, definida como o aumento da concentração dos xenobióticos nos tecidos dos organismos à medida que se encontram em um nível trófico superior, sendo transferidos pela rota dos alimentos, da presa para o predador. Neste contexto, o risco para os seres humanos, consumidores de moluscos e peixes torna-se maior, pois irá ingerir uma quantidade maior de contaminantes. O mecanismo de acumulação para a maioria das substâncias químicas em espécies aquáticas é o intercâmbio com a água. Como organismos aquáticos vivem em ambientes pobres em oxigênio, seu intercâmbio com o ambiente e com substâncias químicas potencialmente acumulativas e perigosas é muito mais efetivo do que nos organismos que inalam agentes do ar (AZEVEDO & CHASIN, 2004).

3 Exposição *in situ* X exposição em laboratório

Quando uma população habitando um local contaminado é analisada, é importante considerar os possíveis efeitos adaptativos que acabam mascarando a contaminação deste ambiente. Foi possível notar esta adaptação nos resultados deste estudo, sendo detectado um índice de danos menor na exposição *in situ* (Capítulo 3). Este evento possivelmente esteja ligado ao fenômeno de resistência múltipla a xenobióticos (MXR) já conhecido em invertebrados aquáticos, que explica a aparente resistência simultânea de diversos invertebrados aquáticos a vários xenobióticos no ambiente. O mecanismo MXR funciona expulsando xenobióticos, incluindo químicos de origem antropogênica, prevenindo seu efeito tóxico aos organismos (JHA, 2004). No caso deste estudo, pode-se sugerir que os moluscos coletados em Itapuã não teriam este sistema muito desenvolvido, uma vez que habitam um ambiente livre de contaminação. Desta forma, estes animais seriam mais sensíveis aos contaminantes, quando expostos a estes em laboratório, do que animais que vivem em locais impactados, sendo esta

sensibilidade refletida na quantidade de danos ao DNA observada. Por outro lado, vem sendo sugerido que diferentes químicos possam inibir este mecanismo. Como resultado, o organismo não detoxifica, mas acumula xenobióticos, incluindo genotoxinas que danificam o DNA ou outros sistemas celulares (JHA, 2004).

Os resultados encontrados para micronúcleos também se relacionam com esta idéia, visto que os organismos expostos *in situ* apresentaram maior freqüência de micronúcleos. Soma-se a este fato as concentrações de elementos inorgânicos evidenciadas neste estudo, uma vez que, embora não tenham forte correlação com os efeitos biológicos observados, podem acarretar danos a médio e longo prazo (como aumento na freqüência de micronúcleos). Elementos como cromo, chumbo, ferro, zinco, entre outros encontrados no corpo mole dos mexilhões em concentrações baixas, têm potencial para causar efeitos adversos caso sejam acumulados em altas concentrações (BEYER *et al.*, 1996; AZEVEDO & CHASIN, 2004). Outro efeito importante a ser considerado é a influência da acumulação de um elemento no processo de acumulação do outro. Este tipo de efeito já é relatado em peixes, sugerindo que o cálcio influí na absorção de cádmio, provavelmente por competição nas vias de absorção (FRANKLIN *et al.*, 2005). Foi possível inferir que o Ca poderia influir na acumulação de alguns elementos pelo mexilhão dourado, uma vez que foi observada a presença de chumbo e rubídio apenas em animais expostos em laboratório, onde a quantidade de Ca se apresentou menor do que a dos animais expostos *in situ*, que por sua vez, não apresentaram Pb e Rb (Capítulo 3). Neste sentido, seria plausível inferir que outros elementos, tais como, sódio e potássio por exemplo, também possam interferir na absorção e consequente bioacumulação de metais em organismos vivos.

Desta forma, a aplicação inicial de biomonitoramento com a avaliação de quebras no DNA, indução na formação de micronúcleos, definição dos locais mais impactados e posterior avaliação *in vitro* de outros compartimentos ambientais, permitiu a obtenção de grande número de informações e a confirmação da principal fonte de contaminação da região. Verificou-se que provavelmente são os

compostos orgânicos os mais envolvidos nas respostas genotóxicas observadas e que o ensaio *Salmonella*/microssoma traz importantes contribuições na avaliação de provável contaminação. No entanto, os resultados apontam o mexilhão dourado como o indicador mais adequado para a detecção de contaminação ambiental por efluentes urbanos, sendo mais sensível do que avaliação *in vitro* de amostras de água e sedimento não extraídas.

4 Avaliação de risco: como usar os resultados de organismos sentinela.

A abordagem essencial da avaliação e do gerenciamento de risco é o entendimento de como o indivíduo, o grupo, a comunidade e a população são afetados com evidências de suas possíveis perdas da vulnerabilidade associada ao risco. É importante compreender que o risco zero é uma condição não atingível pela sociedade nacional e/ou internacional no atual e futuro contexto da globalização. A produção mundial da indústria química, por exemplo, tem projeção de aumentar até 2020 em 85% a produção de 400 milhões de toneladas registrada em 1999. Somado a isto, nos últimos 15 anos diversas substâncias previamente consideradas inertes ou sem efeitos ao homem passaram a ser consideradas carcinogênicas ou tóxicas para o processo reprodutivo (AZEVEDO & CHASIN, 2004).

Quando se fala em avaliação de risco, existem quatro etapas interrelacionadas: identificação do perigo; avaliação dose-resposta; avaliação da exposição e caracterização de risco. A clássica abordagem de avaliação de risco consiste em medir a quantidade do contaminante presente e relacioná-lo com dados experimentais de animais de laboratório e com efeitos adversos causados por dada quantidade deste contaminante. A grande limitação desta abordagem é que têm sido possível definir os níveis de produtos químicos que são críticos para os organismos somente para poucos compostos. Sendo assim, o real cenário de exposição aos compostos químicos abrange grande variedade de organismos expostos e misturas complexas de contaminantes (AZEVEDO & CHASIN, 2004).

A utilização de biomarcadores é de grande importância no processo de avaliação de risco. Neste estudo, foi padronizado um organismo sentinela, *Limnoperna fortunei*, e dois tipos de biomarcadores: o ensaio cometa, considerado um biomarcador de exposição, pois indica que o organismo entrou em contato com o contamiante, mas não informa o grau de efeito adverso que essa exposição pode causar; e o teste de micronúcleos, considerado um biomarcador de efeito, pois demonstra efeito adverso ao organismo pela perda de material genético.

O maior desafio da avaliação de risco está em associar os efeitos prejudiciais de poluentes em organismos sentinela detectados com as possíveis consequências ecológicas. Este obstáculo resulta em uma falha no conhecimento para desenvolvimento de políticas efetivas para o uso sustentável de recursos e proteção ambiental. Uma avaliação efetiva de risco envolve uma abordagem de informações já existentes que correlacionem os processos de absorção de poluentes, detoxificação e efeitos adversos entre eles, com efeitos em níveis mais altos. No caso da Região do Guaíba, análises físico-químicas são realizadas mensalmente, como parte do monitoramento proposto pelo Pró-Guaíba, e diversas avaliações de toxicidade são realizadas por universidades e instituições de pesquisa, somando ainda o monitoramento genotoxicológico periodicamente realizado pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roesler (FEPAM). Seria de grande interesse a avaliação conjunta dos dados visando uma avaliação de risco para a região. Se esta estratégia tem por objetivo influenciar e auxiliar na formulação de decisões na política ambiental, então é crucial demonstrar a políticos, industriais e gestores ambientais a robustez científica das previsões de efeitos a longo prazo de poluentes e também aumentar o conhecimento acerca dos problemas ambientais (MOORE *et al.*, 2004; JHA, 2004).

VII Conclusões

A avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais é uma importante ferramenta na avaliação da contaminação ambiental. A padronização de um organismo biomonitor para a região hidrográfica do lago Guaíba e o biomonitoramento da atividade genotoxicológica nesta região permitiram concluir que:

- a) A aplicação do ensaio cometa e do teste de micronúcleos na hemolinfa do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) mostraram-se “end points” confiáveis na avaliação da genotoxicidade.
- b) O bivalve exótico *L. fortunei* mostrou-se um organismo com potencial para ser biomonitor da genotoxicidade na região hirográfica do Lago Guaíba, sendo sensível aos contaminantes ambientais sulfato de cobre e pentaclorofenol assim como às amostras ambientais, especialmente contaminadas por efluentes urbanos.
- c) A exposição de células da hemolinfa de *L. fortunei* embebidas em agarose a 4.5 J/m² de radiação ultravioleta demonstrou ser um controle positivo que não gera resíduos e eficiente.
- d) A contaminação genotoxicológica, detectada pelo *L. fortunei*, no Lago Guaíba tem origem, principalmente na liberação de esgoto urbano, concentrando os resultados positivos nas amostras do rio Gravataí, arroio Dilúvio e lago Guaíba.
- e) As amostras do rio Jacuí possuem aparentemente indução de genotoxicidade por resíduos da extração de carvão e as amostras do rio Taquarí, por contaminantes da indústria alimentícia.

- f) As amostras da foz do rio dos Sinos e do rio Caí não induziram atividade genotóxica nas células da hemolinfa do mexilhão dourado.
- g) As estações do verão e do inverno apresentaram a maior indução de atividade genotóxica do que a primavera, que por sua vez demonstrou ser a estação com maior volume de precipitação.
- h) As amostras de água superficial do lago Guaíba foram as únicas a induzir mutagênese detectada pelo ensaio *Salmonella*/microssoma, no inverno, com a linhagem TA98 e na presença de ativação metabólica, indicando agentes de ação indireta.
- i) As amostras de lixiviado de sedimento do lago Guaíba não induziram mutagênese detectada pelo ensaio *Salmonella*/microssoma.
- j) A exposição em laboratório provou ser eficiente na detecção da contaminação ambiental de forma similar a exposição *in situ*.
- k) Diversos elementos inorgânicos foram encontrados no corpo mole dos moluscos e nas amostras de água. No entanto, a correlação destes com indução de mutagênese foi fraca, estando restrita a cromo, chumbo, rubídio e estrôncio.
- l) Para a região hidrográfica do Lago Guaíba, nas condições deste estudo, a detecção do efeito biológico em um organismo exposto foi mais eficiente que a detecção de elementos inorgânicos e a avaliação de amostras de compartimentos ambientais, na determinação das principais fontes estressoras da região.

VIII Perspectivas

Os resultados obtidos com a utilização do mexilhão dourado como organismo biomonitor na bacia do lago Guaíba direcionam a compreensão sobre a contaminação por agentes genotóxicos na região, mas também geram mais questões abrindo novas perspectivas, dentre as quais:

- a) Utilizar diferentes métodos de extração de contaminantes orgânicos nas amostras de água e sedimento do lago Guaíba, buscando evidenciar a presença de genotoxinas nesta região pelo ensaio *Salmonella/microsoma*.
- b) Realizar detecções químicas nas amostras de água e sedimentos do lago Guaíba, buscando possíveis contaminantes orgânicos.
- c) Avaliar a presença de elementos inorgânicos pelo método de PIXE em amostras de mexilhão, água e sedimento, buscando compreender a mobilidade e a biodisponibilidade destes elementos nos diferentes compartimentos.
- d) Comparar as sensibilidade do *Limnoperna fortunei*, claramente observada para efluentes urbanos, a amostras que sofrem a influência de diferentes tipologias industriais, buscando compreender a especificidade do organismo biomonitor.
- e) Avaliar a influência de diferentes concentrações de cálcio e potássio na absorção de metais pelo mexilhão dourado utilizando o método de PIXE.
- f) Avaliar a resposta genotóxica pelo ensaio cometa e teste de micronúcleos e a presença de elementos inorgânicos por PIXE em espécies de peixes que tem o mexilhão dourado como fonte de alimento.
- g) Avaliar, por imunoblotting, a presença e quantidade de enzimas de

detoxificação, relacionadas ao mecanismo de resistência múltipla a xenobióticos (MXR), em mexilhões expostos a locais contaminados comparando com animais coletados no local controle, com pouca influência antrópica, buscando compreender uma possível resposta adaptativa.

- h) Utilizar o mexilhão dourado para avaliar a qualidade da água nos locais de captação de água para tratamento.

Bibliografia

ALLEN, J.I. & MOORE, M.N. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental rusk evaluation? *Mar. Env. Res.*, 58: 227 – 232, 2004.

AMARAL, V. S.; MEDINA-SILVA, R.; REGULY, M. L. & ANDRADE, H.H.R. Drosophila wing spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat. Res.*, 583: 67 – 74, 2005a.

AMARAL, V. S.; SINIGAGLIA, M.; REGULY, M. L. & ANDRADE, H. H. R. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the Drosophila Wing-Spot Test. *Env. Pollut.*, 139 (3): 469 – 73, 2005b.

AMES, B. N.; McCANN, J. & YAMASAKY, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31: 347 – 364, 1975.

ARNAIZ, R. R. *Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. La Ciência para Todos.* 2a ed. Fondo de Cultura Económica, 1997.

ASHBY, J. & TENNANT, R. W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U. S. NTP. *Mutat. Res.*, 257: 229- 306, 1991.

AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia.* Rima and Intertox, 2004.

BARNES, W.; TULEY, E. & EISENSTADT, E. Base sequence analysis of his+ revertants of the hisG46 missence mutation in *Salmonella typhimurium*. *Env. Mutag.*, 4: 297 (Abstr. Aa- 1), 1982.

BENDATI, M. M.; SCHWARZBACH, M. S. R.; MAIZONAVE, C. R. M.; ALMEIDA, L. B. & BRINGHENTI, M. L. Avaliação da qualidade da água do lago Guaíba (Rio Grande do Sul, Brasil) como suporte para a gestão da bacia hidrográfica. In: *XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental.* Porto Alegre. Resumos do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, nº V – 076, 2000.

BENDATI, M. M. Entrevista dentro da reportagem: Mexilhão-dourado, veio para

ficar. *Zero Hora*. Porto Alegre, 7 de julho de 2003. Caderno Eureka. 80: 3 – 5.

BEYER, W. N.; HEINZ, G. H. & REDMON-NORWOOD, A. W. *Environmental Contaminants in Wildlife*. SETAC and Clemson and Lewis Publishers, 1996.

BHAMRE, S.; GADEA, B. B.; KOYAMA, C. A.; WHITE, S. J. & FLOWLER, R. G. An aerobic *recA*-, *umuC*- dependent pathway in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 473: 229 – 249, 2001.

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; ROGGERI, P.; FABBRI, R. & VIARENKO, A. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Env. Mol. Mutag.*, 33: 287 - 292, 1999.

BOLOGNESI, C.; BUSCHINI, A.; BRANCHI, E.; CARBONI, P.; FURLINI, M.; MARTINO, A.; MONTEVERDE, M.; POLI, P. & ROSSI, C. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Sci. Tot. Environ.*, 333 (1-3): 127 – 36, 2004.

BOURDON, R. H. *Genes and the Environment*. Taylor & Francis, 1999.

BRASIL, CONAMA resolução no 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 de Março de 2005.

BRUSICK, Evolution of testing strategies for genetic toxicity. *Mutat. Res.* 205: 69 – 78, 1988.

BUTTERWORTH, F. M.; CORKUM, L. D. & GUZMÁN-RINCÓN, J. *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental change*. Plenum Press, 1995.

CAIRNS, J. The interface between molecular biology and cancer research. *Mutat. Res.*, 462: 423 – 428, 2000.

CAPITOLI, R. & BEMVENUTI, C., Entrevista dentro da reportagem: Mexilhão dourado avança pelas águas doces da Zona Sul. *Diário Popular*. Pelotas, 29 de janeiro de 2006, pg 4 – 5.

CATALDO, D. H. & BOLTOVSKOY, D. Yearly reproductive activity of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia) as inferred from the occurrence of its larvae in the plankton of lower Paraná river and the Rio de la Plata estuary (Argentina). *Aqu. Ecol.*, 34: 307-317, 2000.

CARDOZO, T.R.; ROSA, D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.V.; OLIVEIRA, N.C.D.A.; PEREIRA, T.S.; PASTORIZA, T.F.; MARQUES, D.M.; LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. & VARGAS, V.M.F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutat. Res.*, 603: 83 – 96, 2006.

CLAXTON, L.; HOUK,V. S. & HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.*, 410: 237 – 243, 1998.

COLARES, E. R. C.; SUMINSKY, M. & BENDATI, M. M. Mexilhão - dourado em sistemas de abastecimento de água: experiências do Departamento Municipal de Água e Esgotos de Porto Alegre - RS - Brasil. In: *I Encontro Sul-Americano de Integração de Ações para controle do Mexilhão Dourado*, Foz do Iguaçu. Resumos do I Encontro Sul-Americano de Integração de Ações para controle do Mexilhão Dourado, 2003.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V .L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G. & STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.*, 375: 183-193, 1997.

CONCREMAD ENGENHARIA. Comitê lago Guaíba, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler, Departamento de Recursos Hídricos, Secretaria Estadual do Meio Ambiente e Estado do Rio Grande do Sul. *Estudos preliminares para subsídios ao plano de Bacia do Lago Guaíba*. Relatório temático A1, Diagnóstico das disponibilidades hídricas da bacia hidrográfica, Porto Alegre, 2005.

CROSBY, D. G. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Editora Oxford University Press, 1998.

DARRIGRAN, G. A.; DAMBORENEA, M. C. & PENCHASZADEH, P. E. A case of hermaphroditism in the freshwater invading bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (*Mytilidae*) from Rio de la Plata, Argentina. *Soc. Esp. de Malac.*, 16: 99-104, 1998.

DARRIGRAN, G. & DARRIGRAN, J. El mejillón dorado: Una obstinada especie invasora. *Cienc. Hoy*, 11: 61, 2001.

DARRIGRAN, G. & DRAGO, E. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: *Mytilidae*) in South America. *The Naut.*, 114: 69-73, 2000.

DARRIGRAN, G. & PASTORINO, G. The recent introduction of a freshwater asiatic bivalve *Limnoperna fortunei* (*Mytilidae*) into South America. *The Veig.*, 32: 171-175, 1995.

DONNELLY, K. C.; LINGENFELTER, R.; CIZMAS, L.; FALAHATPISHEH, M. H.;

QIAN, Y.; TANG, Y.; GARCIA, S.; RAMOS, K.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. & MUMTAZ, M. M. Toxicity assessment of complex mixtures remains a goal. *Environ. Toxicic. Pharmac.*, 8 (2): 135 – 141, 2004.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455: 81-95, 2000.

FEPM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler. *Qualidade das águas do Rio Gravataí: Período 1992/1994*. Relatório Rede Básica de Monitoramento da FEPM. Porto Alegre, 1996.

FEPM/ GTZ. Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler, Cooperação Técnica Brasil-Alemanha. *Efluentes líquidos industriais: Cargas poluidoras lançadas nos corpos hídricos do estado do Rio Grande do Sul*. Relatório do projeto de cooperação técnica Brasil/Alemanha. Porto Alegre, 1997.

FEPM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler. *Qualidade das águas do Rio dos Sinos*. Relatório Rede Básica de Monitoramento da FEPM. Porto Alegre, 1999a.

FEPM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler. *Qualidade das águas do Rio Caí*. Relatório Rede Básica de Monitoramento da FEPM. Porto Alegre, 1998.

FEPM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler. *Qualidade das águas da bacia hidrográfica do Rio das Antas & Rio Taquari*. Relatório Rede Básica de Monitoramento da FEPM. Porto Alegre, 1999.

FEPM, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler. *web page: <<http://www.fepam.rs.gov.br/>>*. 2006.

FEPM a, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler. Entrevista dentro da reportagem: Praga avança pela Bacia do Guaíba. *Zero Hora*. Porto Alegre, 20 de janeiro de 2006. pg 30.

FRANKLIN, N.M.; GLOVER, C.M. & WOOD, C.M. Calcium/cadmium interactions at uptake surfaces in rainbow trout: waterborne versus dietary routes of exposure. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24 (11): 2954 – 64, 2005.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; SCARCELLI, V.; GORBI, S. & REGOLI, F. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated lagoon. *Aquat. Toxic.*, 53: 19-32, 2001.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C. & SIEDE, W. *DNA Repair and Mutagenesis*.

ASM Press, 1995.

GAUTHIER, L.; TARDY, E.; MOUCHET, F. & MARTY, J. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Sci. of the Tot. Envir.*, 323: 47-61, 2004.

GUIMMLER-LUZ, M. C.; ERDTMANN, B. & BALBUENO, R. A. Analysis of clastogenic effect of Porto Alegre drinking water supplies on mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 279: 227 – 231, 1992.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res.*, 552: 1 – 17, 2004.

KELLER, K .L.; OVERVBECK-CARRICK, T. L. & BECK, D. J. Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV- irradiation, or mitomicin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat. Res.*, 486: 21 – 29, 2001.

KLEIJANS, J. C. S. & VAN SCHOOTEN, F. J. Ecogenotoxicology: the evolving field. *Envir. Toxicol. Pharmac.*, 11: 173-179, 2002.

KLOBUCAR, G. I. V. M.; PAVLICA, M.; ERBEN, R. & PAPES, D. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat. Toxicol.*, 64: 15-23, 2003.

KONOLA, J. Y.; SARGENT, K. E. & GOW, J-B. Efficient repair of hydrogen peroxide-induced DNA damage by *Escherichia coli* requires SOS induction of RecA and RuvA proteins. *Mutat. Res.*, 459: 187 – 194, 2001.

LEE, R. F. & STEINERT, S. Use of the Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay for Detecting DNA Damage in Aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.*, 544: 43-64, 2003.

LEITÃO, A. C. & ALCANTARA GOMES, R. *Radiobiologia e Fotobiologia – Respostas celulares às lesões induzidas por agentes físicos e químicos* (apostila). Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 1997.

LEMOS, C. T. de, & ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes, *Mutat. Res.*, 467: 1 – 9, 2000.

LEMOS, C. T.; VARGAS, V. M. F.; HENRIQUES, J. A. P. & MATTEVI, M. S. Genotoxicity of river water under the influence of petrochemical industrial

complexes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 848 – 855, 1994.

LEMOS, C. T. & TERRA, N. R. Poluição - Causas, Efeitos e Controle. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P (orgs.). *Genética Toxicológica*. Alcance, 119-138, 2003.

LEVIN, D. E.; YAMASAKY, E. & AMES, B. N. A New *Salmonella* Tester Strain for the Detection of Frameshift Mutagens: A Run of Cytosines as Mutational Hot. Spot. *Mutat. Res.*, 94: 315-330, 1982.

MANSUR, M. C. D. Entrevista dentro da reportagem: Mexilhão-dourado, veio para ficar. *Zero Hora*. Porto Alegre, 7 de julho de 2003a. Caderno Eureka. 80: 3 – 5.

MANSUR, M. C. D. Problemática do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* na bacia do Guaíba - Patos, Rio grande do Sul, com uma síntese de 4 anos de pesquisas. In: *I Encontro Sul-Americano de Integração de Ações para controle do Mexilhão Dourado*, Foz do Iguaçu. Resumos do I Encontro Sul-Americano de Integração de Ações para controle do Mexilhão Dourado, 2003b.

MANSUR, M. C. D.; RICHINOTTI, L. M. Z. & SANTOS, C. P. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, 7: 147-149, 1999.

MANSUR, M. C. D.; SANTOS, C. P.; DARRIGRAN, G.; HEYDRICH, I.; CALLIL, C. T. & CARDOSO, F. R. Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. *Rev. Bras. de Zoolog.*, 1(20): 75-84, 2003.

MARON, D. M. & AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173 – 251, 1983.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M. N. & NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res.* 371: 47-55, 1996.

MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W. & LEONARD, D. R .P., An integrate biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 552: 247 – 268, 2004.

MORTELmans, K. & ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455: 29 – 60, 2000.

MOUSTACCHI, E. DNA damage and repair consequences on dose-responce.

Mutat. Res., 404: 33 – 40, 2000.

OHE, T.; WATAMABE, T. & WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.*, 567: 109 – 149, 2004.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I. V. M.; MOJAS, N.; ERBEN, R. & PAPES D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutat. Res.*, 490: 209 – 214, 2001.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I. V. M.; VETMA, N.; ERBEN, R. & PAPES, D. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutat. Res.*, 465: 145 – 150, 2000.

PEAKALL, *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman & Hall, 1992.

PRÁ, D.; LAU, A. H.; KNAKIEVICZ, T.; CARNEIRO, F. R. & ERDTMANN, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarian. *Mutat. Res.* 585 (1-2): 79 – 85, 2005.

PRÓ-GUAÍBA, Programa para o Desenvolvimento Sócio Ambiental da Região Hidrográfica do Guaíba. *web page*. <<http://www.progualiba.rs.gov.br>>. 2006.

PRÓ-GUAÍBA/ FEPAM, Programa para o Desenvolvimento Sócio Ambiental da Região Hidrográfica do Guaíba, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler. *Diagnóstico da poluição gerada pelas áreas industriais localizadas na área da bacia hidrográfica do Guaíba*. Coletânea no. 1. Porto Alegre, 1997.

PRUSKI, A. M. & DIXON, D. R. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis*. L. *Aquat. Toxicol.*, 57: 127-137, 2002.

RANK, J. & JENSEN, K. Comet assay on gill and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mutat. Res.*, 54: 323-329, 2003.

ROLLA, H. C. *Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimentos do rio Guaíba e lodo proveniente da indústria de papel e celulose*. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

ROLLA, H. C. & HENRIQUES, J. A. P. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e Lodo proveniente da indústria de papel e celulose. *O Papel*, 11: 85 - 93, 1996.

ROLLA, H. C. & HENRIQUES, J. A. P. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de lodo proveniente da indústria de papel e celulose. *O Papel*, 12: 95 - 99, 1997.

SECRETARÍA DA COORDENAÇÃO E PLANEJAMENTO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, Secretaría executiva do PRÓ-GUAÍBA. *Baía de todas as águas: preservação e gerenciamento ambiental na bacia hidrográfica do Guaíba*. Porto Alegre, 1998.

SILVA, R. M. da. *Genotoxicidade associada a amostras de água do rio Caí sob influência de dejetos urbanos*. Tese de mestrado em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

SILVA, J.; HEUSER, V. & ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P (orgs.). *Genética Toxicológica*. Alcance, p 167-180, 2003.

SINGH, N. P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.*, 455: 111 – 127, 2000.

SYLVESTER, F.; DORADO, J.; BOLTOVSKOY, D.; JUÁREZ, A. & CATALDO, D. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiol.*, 534: 71 - 80, 2005.

TICE, R. R. Applications of the Single Cell Gel Assay to Environmental Biomonitoring for Genotoxic Pollutants. *Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, p 69-79, 1995.

VARGAS, V. M. F., *Avaliação de Testes para Triagem e Diagnóstico de Agentes Genotóxicos Ambientais*. Tese de Doutorado em Ciências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.

VARGAS, V. M. F.; GUIDOBONO, R. R.; JORDÃO, C. & HENRIQUES, J. A. P. Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration / extraction procedures. *Mutat. Res.*, 343: 31- 52, 1995.

VARGAS, V. M. F.; MIGLIAVACCA, S. B.; MELO, A. C. de; HORN, R. C.; GUIDOBONO, R. R.; FERREIRA, I. C. F. S. & PESTANA, M. H. D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat. Res.*, 490: 141 – 158, 2001.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P. & HENRIQUES, J. A. P. Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames test (Salmonella/microsome). *Revis. Bras. de Genét.*, 11 (3): 505 –

518, 1988.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P. & HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.*, 319: 31- 45, 1993.

VILLELA, I. V. *Avaliação genotóxica pelo teste Salmonella/microssoma e determinação de contaminantes químicos de amostras de água superficial da bacia do Guaíba*. Dissertação de mestrado Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H .C. & SILVEIRA, J. D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P (orgs.). *Genética Toxicológica*. Alcance, p. 147 – 166, 2003.

WATERS, M. D.; STACK, H. F. & JACKSON, M. A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutat. Res.*, 437: 21 – 49, 1999.

WHITE, P. A. & RASMUSSEN, J. B. SOS chromotest results in a Broader context: Empirical relationships between genotoxic potency, mutagenic potency ,and carcinogenic potency. *Envir. Molec. Mutag.*, 27: 270 – 305, 1996.

WHITE, P.A. & RASMUSSEN, J.B. The genotoxic of domestics wastes in surface waters. *Mutat. Res.*, 410: 223 – 238, 1998.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? *Mutat. Res.*, 492: 29 – 38, 2001.

Anexo - Curriculum vitae

VILLELA, I.V.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Izabel Vianna Villela

Local e data de nascimento: Pelotas, RS, Brasil, 09 de janeiro de 1978

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500, setor 4, Prédio 43421, Centro de Biotecnologia, UFRGS, sala 112.

Telefone profissional: (51)33166069

E-mail: ivillela@terra.com.br

2. FORMAÇÃO

Bacharelado em Ciências Biológicas (Universidade Federal de Pelotas, 1995 - 1998); Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999 - 2001).

3. ESTÁGIOS

Estágio não remunerado junto ao programa de Monitoração e Pesquisa em Malformações Congênitas na UFPel / UCPel, cumprindo a carga horária de 12 horas semanais, sob a orientação do professor Gilberto de Lima Garcia, durante o período de 12 de dezembro de 1995 a 30 de dezembro de 1997. Durante este período foram desenvolvidas atividades de pesquisa hospitalar e reuniões científicas.

Acompanhamento Docente, não remunerado, com o professor Gilberto de Lima Garcia, na área de Genética Humana, cumprindo uma carga horária de 12 horas semanais durante o período de 15 de junho de 1996 a 15 de janeiro de 1997. Durante este período foram desenvolvidas atividades de pesquisa hospitalar e reuniões científicas.

Monitoria (com bolsa) da disciplina de Genética Geral, junto ao Departamento de Zoologia e Genética da UFPel, sob orientação da Professora Vera Lúcia Bobroowski, durante o período de maio a julho de 1997 somando um total de 144 horas. Foram desenvolvidas atividades de auxílio em aulas teóricas e de exercícios.

Participação como bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – CNPq / UFPel, atuando no projeto “Alterações fisiológicas induzidas por substâncias radiomiméticas em vegetais superiores” sob a orientação do professor Fernando Luís Caprio da Costa do Departamento de Zoologia e Genética da Universidade Federal de Pelotas. Durante o período de 08/97 à 07/98, somando 12 horas semanais, foram desenvolvidas atividades nas áreas de citogenética e radiogenética relacionadas ao projeto.

Estágio não remunerado na Universidad Politécnica de Cataluña – Barcelona, ES - no período entre 19 de janeiro e 16 de março de 1998, somando 30 horas semanais, sob orientação da professora Núria Saperas, através do Programa de Cooperação Interuniversitária agenciado pela Agência Espanhola de Cooperação Internacional. Neste período foram desenvolvidas atividades de pesquisa na área de obtenção, purificação e cristalização de proteínas.

Participação como tutora de alunos de graduação em Ciências Biológicas, junto à disciplina BIO12007 – Biologia Molecular Básica do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS durante o segundo semestre de 1999 como parte do projeto “Ensino da Biologia Molecular através de um Processo Formativo” PROIM – CAPES.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Destaque Salão de Iniciação Científica, Universidade Luterana do Brasil, 2003. Aluno Juliano Silveira

Destaque Salão Iniciação Científica Seção Mutagêneses, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. Aluno Iuri Marques de Oliveira.

Prêmio Conhecimento das Águas / ABES - RS, Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba, 2004.

The Environmental Mutagen Society Travel Award, 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, CA, USA, setembro de 2005.

Prêmio Conhecimento das Águas / ABES - RS, Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba, 2005.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

Orientação do estágio para a conclusão do curso de Técnico em Química do Aluno Carlos Preto da Fundação Escola Técnica Liberato, Salzano Vieira da Cunha, Novo Hamburgo, realizado nas instalações do Laboratório GENOTOX, 2001.

Orientação de Iniciação Científica, CNPq e FAPERGS, realizada nas instalações do Laboratório GENOTOX, 2002 – 2004.

Disciplina “Contaminação Ambiental X Dano Genético”, programa de pós Graduação em Biotecnologia Agrícola na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS com duração de 40h, 2003.

Palestra “Avaliação da Genotoxicidade Ambiental” durante o Congresso Sul-

Riograndense de BioCiências, no período de 10 – 13 de setembro de 2003 na Universidade Católica de Pelotas, Pelotas – RS.

Banca do Trabalho de Conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas – Ênfase Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS. “ Utilização do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) como biomonitor do potencial Genotóxico da bacia do Guaíba”. Aluno Iuri Marques de Oliveira. 16 dezembro de 2004.

Palestra “Genotoxicidade” durante o I Encontro Regional de Biologia Urbana, nos dias 25 e 26 de novembro de 2004 no Centro Universitário Nilton Lins, Manaus-AM.

Banca da Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, UFPel, Pelotas, RS. "Avaliação da genotoxicidade das Xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *Xanthomonas campestris* pv pruni através do ensaio cometa e teste de micronúcleos". Aluna Rutilene Jacondino Roll. 29 de julho de 2005.

Responsável pela Unidade de Garantia da Qualidade do GENOTOX-Labotatório de Genotoxicidade Maio de 2006 – atual.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

VILLELA, I. V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H .C. & SILVEIRA, J. D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P (orgs.). *Genética Toxicológica*. Alcance, p. 147 – 166, 2003.

SILVEIRA, J.; VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. A Utilização do Mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)) como Biomonitor de Genotoxicidade Ambiental. *Revista de Iniciação Científica da Ulbra*, 2: 83-94, 2003.

VILLELA, I. V. & HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicidade Urbana In: *Biologia Urbana* (em impressão)

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) Exposed to Environmental Contaminants. *Mutat. Res.*, 697: 78 – 86, 2006.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

VILLELA, I. V. & COSTA, F. L. C. Efeito de Ondas Eletromagnéticas Ultracurtas em Cromossomos Mitóticos de Cebola Allium cepa In: VI Congresso de Iniciação Científica FURG/UFPel/UCPel, Rio Grande. Livro de resumos do VI Congresso de Iniciação Científica FURG/UFPel/UCPel, p.149, 1997.

VILLELA, I. V.; COSTA, F. L. C.; TORRES, S. F. & BOBROWSKI, V. L. Efeitos de Ondas Eletromagnéticas Ultracurtas em Cromossomos Mitóticos de Cebola In: XI Encontro de Geneticistas do RS, Pelotas. Livro de resumos do XI Encontro de Geneticistas do RS, p.61, 1998.

VILLELA, I. V.; TORRES, S. F.; COSTA, F. L. C. & BOBROWSKI, V. L. Efeitos de Piretróides Cintéticos em Cromossomos Mitóticos de Cebola In: V Congresso Latino Americano de Mutagenese, Carcinogenese e Teratogenese Ambiental, Curitiba. Livro de resumos do V Congresso Latino Americano de Mutagenese, Carcinogenese e Teratogenese Ambiental, v.21, p.57, 1998.

VILLELA, I. V.; COSTA, F. L. C.; TORRES, S. F. & BOBROWSKI, V. L. Análise Cromossomos Mitóticos de Cebola Allium cepa submetidos a Ondas Eletromagnéticas Ultracurtas In: V Congresso Latino Americano de Mutagenese, Carcinogenese e Teratogenese Ambiental, Curitiba. Livro de resumos do V Congresso Latino Americano de Mutagenese, Carcinogenese e Teratogenese Ambiental, v.21, p.56, 1998.

VILLELA, I. V.; HENRIQUES, J. A. P. & ERDTMANN, B. Avaliação Genotoxicológica e Química de Amostras Ambientais In: 1a Reunião Anual do Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre. Livro de resumos da 1a Exposição de Trabalhos, p05, 1999.

VILLELA, I. V.; PERALBA, M. C.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P. Avaliação Genotoxicológica e Química de Amostras Ambientais. In: II Reunião Anual do Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre. Livro de resumos da II Reunião Anual do Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular, p.63, 2000.

VILLELA, I. V.; HENRIQUES, J. A. P. & ERDTMANN, B. Avaliação Genotoxicológica e Química de Amostras Ambientais In: VI Encontro de

Ecotoxicologia e III Reunião da SETAC Latino Americana, São Carlos. Livro de resumos do VI Encontro de Ecotoxicologia e III Reunião da SETAC Latino Americana. p.122, 2000.

VILLELA, I. V.; HENRIQUES, J. A. P.; PERALBA, M. C.; ERDTMANN, B. & DIAS, J. F. Avaliação Genotóxica pelo teste de Ames e de Contaminantes Químicos de Amostras de Água Superficial da Bacia do Guaíba In: V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, Gramado. Livro de resumos do V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, v.único. p.57, 2001.

VILLELA, I. V.; HENRIQUES, J. A. P.; ERDTMANN, B.; PERALBA, M. C. & DIAS, J. F. Avaliação Genotóxica pelo Teste de Ames e de Contaminantes Químicos de Amostras de Água Superficial da Bacia do Guaíba In: V Congresso de Ecologia do Brasil, Porto Alegre. Livro de resumos do V Congresso de Ecologia do Brasil, 2001.

VILLELA, I. V.; PERALBA, M. C.; DIAS, J. F.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P. Avaliação genotoxicidade pelo teste Salmonella/microsoma e de contaminantes químicos das águas da bacia do Guaíba In: VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião da Setac Latino-Americana, Vitória. Livro de resumos da VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião da Setac Latino Americana, p.318, 2002.

VILLELA, I. V.; PRA, D.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. Padronização do mexilhão dourado (*Limnoperma fortunei*) como espécie biomonitora da poluição no lago Guaíba In: VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião da Setac Latino Americana, Vitória. Livro de resumos da VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião da Setac Latino Americana, p.328,2002.

VILLELA, I. V.; SILVA, J.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P. Padronização do Mexilhão Dourado (*Limnoperma fotrunei*) como Espécie Biomonitora da Poluição no Lago Guaíba In: IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre. Livro de resumos da IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, p.87, 2002.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. *Limnoperma fortunei* as sentinel organism: Genotoxic evaluation of the Guaíba Basin (Porto Alegre - RS) In: 4th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, Florianópolis. Genetics and Molecular Biology . Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v.26. p.144, 2003.

VILLELA, I. V.; SILVEIRA, J. C.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. A utilização do mexilhão Dourado (*Limnoperna Fortunei*) como Biomonitor de

Genotoxicidade Ambiental In: V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre. Livro de resumos da V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, p.72 2003.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. A Padronização do mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei*) como espécie Biomonitora de Contaminantes Ambientais In: V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre. Livro de resumos da V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, p.73 2003.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. A Biomonitoramento da Atividade Genotóxica na Bacia do Lago Guaíba (Porto Alegre, RS) In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre. Livro de resumos da VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, p.98, 2004.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. A Biomonitoramento da Atividade Genotóxica na Bacia do Lago Guaíba (Porto Alegre, RS) In: VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Florianópolis. Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, p.195, 2004.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. A Utilização do Mexilhão Dourado (*Limnoperna Fortunei*) como Organismo Biomonitor do Potencial Genotóxico na Bacia do Lago Guaíba In: VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, Natal. Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v.28. p.194 – 194, 2005.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P. A Seasonal Genotoxicity Biomonitoring of the Guaíba Lake Basin Using the Goldem Mussel as Sentinel Organism In: 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco. 9th International Conference on Environmental Mutagens Abstracts / Suplement of Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. San Francisco: 9th ICEM, p.194 - 194, 2005.