ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TESTES DE MICRONÚCLEOS EM CAMUNDONGOS E EM ERITRÓCITOS PERIFÉRICOS DE *Oreochromis niloticus* NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DOS AGROTÓXICOS DELTAMETRINA, DICOFOL, GLIFOSATO E IMAZAPYR

ANNA CHRISTINA COUTINHO DO NASCIMENTO *
CESAR KOPPE GRISOLIA **

O teste de micronúcleos (MN) tem sido muito empregado na detecção e monitoramento de compostos genotóxicos no meio ambiente. Diferentes organismos podem ser utilizados como sistema bioindicador. O sistema-teste clássico é o MN em células de medula óssea de camundongos, validado por todas as principais agências de proteção ambiental e organizações internacionais. Contaminantes químicos de recursos hídricos podem ser investigados quanto ao seu potencial genotóxico em organismos mais adequados, como os peixes. Efetuou-se análise comparativa das frequências de MN entre camundongos e peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, utilizando duas substâncias conhecidas clastogênicas, a mitomicina C e a ciclofosfamida, além de quatro agrotóxicos, Deltametrina, Dicofol, Glifosato e Imazapyr. Observou-se total correspondência de resultados entre ambos os sistemas-teste, demonstrando que os peixes da espécie *O. niloticus* apresentam sensibilidade para serem usados na detecção de compostos genotóxicos como contaminantes de ambientes aquáticos.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por agrotóxicos pode ser estimada pelo monitoramento de parâmetros químico-analíticos e biológicos. Pelos métodos biológicos são avaliados os efeitos adversos que provocam alterações bioquímicas e fisiológicas nos organismos como, por exemplo, medições nos níveis de acetilcolinesterase para organofosforados e carbamatos.

* Bolsista de Iniciação Científica, (PIBIC-CNPq), Universidade de Brasília (UnB), Prof. Adjunto IV, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Biociências (IB), UnB, Brasília, DF. (e-mail: grisolia@unb.br).

O teste do micronúcleo tem sido muito utilizado para avaliar os efeitos de compostos mutagênicos presentes no meio ambiente. Os micronúcleos correspondem a fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros presentes no citoplasma das células, resultantes de lesões na estrutura cromossômica ou no aparelho mitótico, respectivamente. Assim, aumentos nas frequências de micronúcleos são considerados resultados de lesões causadas por agentes mutagênicos. Na pesquisa de agentes mutagênicos em ambientes aquáticos, esta técnica tem sido aplicada em invertebrados e em vertebrados (IARC, 1991).

A contaminação de importantes recursos hídricos por agrotóxicos tornou-se problema preocupante em diferentes países, pois pode inviabilizá-los para o consumo humano. O teste do micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico vem sendo aplicado em diferentes espécies de peixes para se avaliar o potencial mutagênico de poluentes aquáticos. Peixes coletados em águas poluídas apresentam frequências aumentadas de micronúcleos, as quais podem variar conforme a estação do ano, tipo de poluição e com a espécie estudada. Do mesmo modo, testes com peixes em laboratório acusaram o potencial mutagênico de vários poluentes aquáticos (KLIGERMAN, 1982; De FLORA et al., 1993 e MINISSI et al., 1996).

Neste estudo, os inseticidas Deltametrina e Dicofof e os herbicidas Glifosato e Imazapyr foram testados, em laboratório, com o objetivo de verificar seu potencial indutor de micronúcleos em eritrócitos de sangue circulante de *Oreochromis niloticus* (Tilapia nilótica) e em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongos da linhagem albino Swiss. A Deltametrina, um inseticida piretróide, apresenta resultados contraditórios para mutagenicidade. Em *Salmonella typhimurium*, cepas TA98 e TA100 e em leveduras não induziu mutações gênicas. No entanto, em *Allium cepa* e em camundongos induziu aberrações cromossômicas (IARC, 1991). O Dicofof, inseticida/acaricida clorado, quando testado em *Escherichia coli* WP2 (trp) e nas cepas TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, com e sem ativação metabólica por fração S-9 de fígado de rato, não apresentou efeitos mutagênicos. Porém, seus produtos de metabolização apresentaram atividades mutagênicas para a cepa TA100 de *S. typhimurium* (PLANCHE et al., 1979). Em células meristemáticas de *Vicia faba* o Dicofof induziu a formação de pontes anafásicas. Em células de pulmão de Hamster Chineses não induziu aberrações cromossômicas, entretanto induziu micronúcleos em células de medula óssea de ratos (IARC, 1983). O herbicida Glifosato tem apresentado resultados positivos em diferentes sistemas-teste, quando estudado mediante formulação (Roundup). Entretanto, os testes somente com o ingrediente (o sal glifosato-isopropilamônio) geralmente apresentam resultados negativos para mutagenicidade (KALE et al., 1995; CLEMENTS et al., 1997 e LI & LONG, 1988). Com relação ao Imazapyr verifica-se ausência de dados na literatura sobre o seu potencial mutagênico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRONÚCLEOS EM *O. niloticus*

Oreochromis niloticus (Cyclidae), também conhecida como Tilapia nilótica, foram coletadas no Lago Paraná, em Brasília e aclimatadas por 7 dias no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB), em tanques de 500 L de água filtrada decolorificada e aerada constantemente. Os peixes foram alimentados com larvas do coleoptero *Tenebrio molitor*, criadas no laboratório. A frequência basal de micronúcleos foi monitorizada no Lago Paraná, durante 3 anos (1995-1998), sendo analisados mais de 150 exemplares. As amostras de Dicofof (Kelthane 480), Deltametrina (Decis 25 CE) e Glifosato (Roundup 69) foram coletadas na Fazenda da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, enquanto o produto Imazapyr técnico foi cedido pela Companhia Cyanamid Química do Brasil.

Os tratamentos consistiram na aplicação de Deltametrina nas doses de 1,0; 5,0 e 15,0 mg/kg peso. Dicofof nas doses de 25,0; 50,0 e 100,0 mg/kg peso. Glifosato (Roundup 69) a 42; 85 e 170 mg/kg peso e Imazapyr a 20; 40 e 80 mg/kg peso. Todos os tratamentos foram feitos via intraperitoneal, dose única e por 4 dias. Para os 4 agrotóxicos, a dose mais alta representa a dose máxima tolerada (DMT), previamente testada. Como controle positivo foram utilizados dois compostos conhecidamente clastogênicos, mitomicina C na dose de 1,0 mg/kg peso e ciclofosfamida na dose de 40 mg/kg peso, que também representavam a DMT.

Preparo das lâminas: coletou-se 0,3 mL de sangue dos vasos do arco branquial, com seringa não heparinizada e imediatamente efetuou-se o esfregaço. As lâminas foram secas ao ar por 12 h, fixadas em metanol por 10 minutos e coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato na proporção de 1:30 mL por 7 minutos. Foram analisados 3.000 eritrócitos de sangue periférico por peixe pelo teste-cego para a contagem dos micronúcleos.

2.2 MICRONÚCLEOS EM CAMUNDONGOS

O teste do micronúcleo em camundongos foi realizado de acordo com SCHMID (1976). Grupos de 6 camundongos foram tratados, via intraperitoneal, com as doses de 8,0; 33,0 e 90,0 mg/kg peso da formulação comercial de Decis 25 (Deltametrina), em duas aplicações com intervalo de 24 h, sendo que as células de medula óssea foram coletadas 24 h após a segunda aplicação. O mesmo protocolo experimental foi aplicado para o Dicofof (Kelthane 480 CE), nas doses de 50; 100 e 200 mg/kg peso. Com os herbicidas Glifosato (Roundup) e Imazapyr aplicou-se também o mesmo protocolo de tratamento, com as doses de 50; 100 e 200 mg/kg peso e 9; 18 e 36 mg/kg peso respectivamente. Foram

analisados ml eritrócitos policromáticos (EPC) e ml normocromáticos (ENC) na pesquisa de micronúcleos e para a análise das proporções policromáticos/normocromáticos.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios com os peixes e camundongos foram submetidos a análise estatística, usando-se o teste Qui-quadrado (X^2 , $P = 5\%$). Analisaram-se as proporções de micronúcleos entre os diferentes tratamentos e seus respectivos controles, bem como as proporções entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos dos camundongos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mitomicina C e a ciclofosfamida aumentaram as frequências de micronúcleos em ambos os sistemas-teste (Tabelas 1 e 2). Com relação aos inseticidas, verificou-se que a Deltametrina, na dose mais baixa de 1,0 mg/kg, provocou elevada frequência de micronúcleos em *O. niloticus*. Neste grupo, de 7 peixes analisados, 3 apresentaram as mais altas frequências de micronúcleos, ocorrendo variabilidade muito grande nas respostas. Em camundongos não se observou indução de micronúcleos nos três grupos de tratamento. Entretanto, outra formulação de Deltametrina, Decis 28 EC, bem como o ingrediente ativo com 99,46% de pureza apresentaram respostas positivas quanto à indução de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos (BHUNYA & PATI, 1990 e GANDHI et al., 1995). O produto Dicofol não induziu micronúcleos em ambos os sistemas-teste. Entretanto, de acordo com o IARC (1983), o Dicofol aumentou as frequências de micronúcleos em células de medula óssea de ratos.

O Glifosato (Roundup) apresenta respostas tanto positivas como negativas em diferentes sistemas-teste. Deve-se salientar que o Glifosato em formulações, como o Roundup, tende a exibir resultados positivos, enquanto que o ingrediente ativo, sal glifosato-isopropilamina, apresenta resultados negativos (LI & LONG, 1988; KALE et al., 1995 e CLEMENTS et al., 1997). Dois tratamentos apresentaram resultados positivos em *O. niloticus*, Deltametrina (1,0 mg/kg) e Glifosato (85 mg/kg). Entretanto, houve variação muito grande no número de micronúcleos entre os exemplares do mesmo grupo de tratamento, resultando em alto desvio padrão. Este fenômeno de casualidade sugere que se utilize amostras experimentais maiores (Tabela 1). Em camundongos não se observou tal variabilidade interindividual dentro dos grupos de tratamento. A relação EPC/ENC não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que as doses mais altas não afetaram o sistema proliferativo da medula óssea dos camundongos (Tabela 2 e Quadro 1).

TABELA 1 - MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE *Oreochromis niloticus*, TRATADOS COM DELTAMETRINA, DICOFOL, GLIFOSATO, IMAZAPYR, MITOMICINA C E CICLOFOSFAMIDA

mg/Kg	Grupo de tratamento	Células analisadas	Total de micronúcleos	Frequências médias de MN	Porcentagem de MN
Inseticidas	Controle	8	24.000	6	0,8 ± 0,2
	Mitomicina C	6	18.000	18*	3,0 ± 0,6*
	Ciclofosfamida	6	18.000	30*	5,0 ± 1,0*
	Deltametrina	7	21.000	20*	2,9 ± 2,6*
	1,0	6	18.000	4	0,7 ± 0,3
Dicofol	15,0	9	27.000	5	0,6 ± 0,1
	50,0	8	24.000	4	0,5 ± 0,3
	100,0	7	21.000	6	0,9 ± 0,5
	200,0	6	18.000	4	0,7 ± 0,2
Herbicidas	Glifosato	8	24.000	7	0,8 ± 0,5
	42	10	30.000	16*	1,6 ± 1,6*
	85	8	24.000	4	0,5 ± 0,1
	170	6	18.000	4	0,6 ± 0,1
	Imazapyr	7	21.000	2	0,2 ± 0,05
Imazapyr	20	9	27.000	3	0,3 ± 0,02
	40				
	80				

X^2 , $P < 0,05$; MN = micronúcleos.

O produto Imazapyr não apresentou qualquer indução de micronúcleos em ambos os sistemas-teste (X^2 , $P > 0,05$) e tratando-se de herbicida recente no mercado não se encontram dados sobre o seu potencial mutagênico. *Oreochromis niloticus*, *Tilapia rendalli* e *Cyprinus carpio* coletados no Lago Paranoá e tratados com ciclofosfamida, mitomicina C, bleomicina e 5-fluorouracil, por períodos de 2 a 30 dias apresentaram aumento significativo em suas frequências de micronúcleos, demonstrando que tais espécies são sensíveis a ação de agentes clastogênicos (GRISOLIA & CORDEIRO, 2000).

TABELA 2 – MÉDIA DOS MICRONÚCLEOS EM ERIÓCITOS POLICROMÁTICOS E NORMOCROMÁTICOS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM DELTAMETRINA, DICOFOL, GLIFOSATO, IMAZAPYR, MITOMICINA C E CICLOFOSFAMIDA

mg/kg	Grupo de tratamento	MN EPC	MN ENC	EPC/ENC
Controle	6	1,5 ± 0,05	0,5 ± 0,01	489/1.000
Mitomicina C	6	5,8 ± 0,2*	2,0 ± 0,1	584/1.000
Ciclofosfamida	6	8,6 ± 0,5*	4,5 ± 0,4	424/1.000
<i>Inseticidas</i>				
Deltametrina	6	1,8 ± 0,06	0,0	550/1.000
8,0	6	2,6 ± 0,8	0,6 ± 0,05	471/1.000
33,0	6	3,0 ± 0,4	0,3 ± 0,01	725/1.000
<i>Dicofol</i>				
50,0	6	1,5 ± 0,04	0,5 ± 0,01	396/1.000
100,0	6	1,0 ± 0,05	0,4 ± 0,01	312/1.000
200,0	6	1,0 ± 0,03	0,5 ± 0,01	302/1.000
<i>Herbicidas</i>				
Glifosato	6	0,7 ± 0,01	0,6 ± 0,01	425/1.000
50,0	6	0,6 ± 0,02	0,5 ± 0,04	630/1.000
100,0	6	0,8 ± 0,01	0,7 ± 0,03	375/1.000
200,0	6	2,0 ± 0,02	0,8 ± 0,01	383/1.000
Imazapyr	6	1,5 ± 0,01	0,7 ± 0,02	498/1.000
9,0	6	0,8 ± 0,01	0,3 ± 0,01	563/1.000
18,0	6			
36,0	6			

* χ^2 , $P < 0,05$; EPC = eritrócitos policromáticos; ENC = eritrócitos normocromáticos.
MN = micronúcleos.

QUADRO 1 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE OS TESTES DE MICRONÚCLEOS EM CAMUNDONGOS E EM PEIXES

Substância-teste	Camundongo	<i>O. niloticus</i>
ciclofosfamida	+	+
mitomicina C	+	+
Deltametrina	-	-
Dicofol	-	-
Glifosato	-	-
Imazapyr	-	-

+ induziu micronúcleos, - não induziu micronúcleos.

4 CONCLUSÃO

A exposição dos camundongos e *O. niloticus* a compostos conhecidamente clastogênicos provocou a indução de micronúcleos. Entretanto, na exposição aos quatro agrotóxicos em 3 diferentes doses, sendo a mais alta a dose máxima tolerada, ambos os sistemas apresentaram resultados negativos. Observou-se assim, correspondência de resultados entre os dois sistemas-teste.

Os quatro agrotóxicos testados apresentam risco de contaminação de recursos hídricos, devido ao uso em larga escala e práticas agrícolas inadequadas. Busca-se no Brasil, mecanismo de controle efetivo contra as macrofitas aquáticas nas barragens das hidroelétricas e neste contexto os herbicidas Glifosato e Imazapyr evidenciaram potencial de uso.

Abstract

Micronucleus (MN) test has been widely used in the detection and monitoring of genotoxic compounds in the environment. Several test organisms can be used as biomarkers. The classic system-test is MN in cells of medulla of rats, validated by all the main agencies of environmental protection and international organizations. Water resources contamination by pesticides could be investigated by its genotoxic potential with suitable organisms such as the fish. In this study, mouse bone marrow erythrocytes MN and *Oreochromis niloticus* (Tilapia nilotica) peripheral erythrocytes MN frequencies were compared. Cyclophosphamide (CP) and mitomycin C (MMC) were used as known clastogens, furthermore 4 pesticides such as Deltamethrin, Dicofol, Glyphosate and Imazapyr. Results showed a relationship between mouse and fish test-system showing that the fish from *O. niloticus* species have sensibility in the detection of genotoxic compounds as pollutants of aquatic environments.

REFERÊNCIAS

- 1 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. WHO, v. 53, p. 33-92, 1991.
- 2 KLIGERMAN, A. D. Fishes as biological detectors of the effects of genotoxic agents. In: HEDDLE, J.A. *Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology*. New York: Academic Press, 1982. Cap 16, p. 192-235.
- 3 DE FLORA, S.; VIGARIO, L.; D'AGOSTINI, F.; CAMOIRANO, A., BAGNASCO, M.; BENNECELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Res.*, v. 319, p. 167-177, 1993.

- 4 MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Res.*, v. 367, n. 4, p. 245-251, 1996.
- 5 PLANCHE, G.; CROISY, A.; MALAVEILLE, C.; TOMATIS, L.; BARTSCH, H. Metabolic and mutagenicity studies on DDT and 15 derivatives. *Chem. Biol. Interact.*, v. 25, n. 2-3, p. 157-175, 1979.
- 6 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Miscellaneous pesticides. *WHO*, v. 30, p. 87-101, 1983.
- 7 KALE, P. G.; PETTY, B. T.; WALKER, S.; FORD, J. B.; DEHKORDI, N.; TARASIA, S.; TASIE, B. O.; KALE, R.; SOHNI, Y. R. Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 25, p. 148-153, 1995.
- 8 CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 29, n. 3, p. 277-88, 1997.
- 9 LI, A. P.; LONG, T. J. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. *Fundam. Appl. Toxicol.*, v. 10, n. 3, p. 537-546, 1988.
- 10 SCHMID W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: HOLLAENDER, A. **Chemical mutagens, principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976. v. 4, p. 31-53.
- 11 BHUNYA, S. P.; PATI, P. C. Effect of deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. *Mutagenesis*, v. 5, n. 3, p. 229-232, 1990.
- 12 GANDHI, G.; CHOWDHURY, J. B.; SAREEN, P. K.; DHILLON, V. P. S. Genotoxic effects of deltamethrin in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutation Res.*, v. 346, p. 203-206, 1995.
- 13 GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 1, p. 235-239, 2000.