JOURNAL OF EDUCATION, SCIENCE AND HEALTH – JESH
Revista de Educação, Ciência e Saúde
DOI: https://www.doi.org/10.52832/jesh.v3i3.220
Home page: https://bio10publicacao.com.br/jesh
e-ISSN: 2763-6119

INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENOTÓXICAS EM *Hoplosternum Littoralle*, FRENTE A CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL, COM O USO DO TESTE DO MICRONÚCLEO

INVESTIGATION OF GENOTOXIC CHANGES IN *Hoplosternum Littoralle*, IN FRONT OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION, USING THE MICRONUCLEUS TEST

INVESTIGACIÓN DE CAMBIOS GENOTOXICOS EN *Hoplosternum Littoralle*, ANTE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL, UTILIZANDO LA PRUEBA DE MICRONÚCLEO

Emily Catarine da Silva Soares[1]; **Francijara Araújo da Silva**[2]

[1] Graduanda em Enfermagem no Centro Universitário do Norte (UNINORTE), Manaus, Amazonas, Brasil;
[2]Orientadora/Doutora em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (INPA). Docente pelo Centro Universitário do Norte (UNINORTE), Manaus, Amazonas, Brasil;
*Autor correspondente: emilycatarinereis@gmail.com

Recebido: 24/06/2023 | **Aprovado**: 22/09/2023 | **Publicado**: 28/09/2023

Resumo: O teste do micronúcleo (MN) é uma análise rápida e simples, que detecta a presença de danos genotóxicos no material genético de indivíduos expostos a agentes clastogênicos. Esse teste vem sendo utilizado para mensurar o grau de exposição aos contaminantes ambientais que causam efeitos genotóxicos. Esse estudo analisou a presença de alterações genotóxicas, utilizando o teste do micronúcleo, em células de peixe da espécie *Hoplosternum littorale* (tamoatá). Foram analisadas 20 amostras coletadas nos igarapés da Comunidade da Sharp, Presidente Dutra e Ponte da Paraíba, em Manaus, Amazonas. Esses ambientes são poluídos por efluentes que são lançados em suas águas. Foram analisadas 1000 células por lâmina (n = 20.000 células analisadas no total), no período de outubro a novembro de 2022, foram analisadas no laboratório multidisciplinar do Centro Universitário do Norte- UNN, na cidade de Manaus. Foram identificados 82 micronúcleos nas células da espécie amostrada dos três igarapés. Os indivíduos coletados no igarapé da Comunidade da Sharp, apresentaram um total de micronúcleos muito maior, correspondendo a 73,1 % do total desses danos, em comparação os indivíduos dos outros igarapés (Ponte Presidente Dutra 17,07% e Ponte da Paraíba 9,7%). A quantidade de micronúcleos é significativa, qualitativamente para indicativo de possíveis agentes causadores de danos genotóxicos nos peixes analisados, provenientes desses ambientes.

Palavras-chave: Contaminantes ambientais. Frequência de micronúcleos. Genotoxicidade. Mutagenicidade

Abstract: The micronucleus (MN) test is a quick and simple analysis that detects the presence of genotoxic damage in the genetic material of individuals exposed to clastogenic agents. This test has been used to measure the degree of exposure to environmental contaminants that cause genotoxic effects. This study analyzed the presence of genotoxic changes, using the micronucleus test, in fish cells of the species Hoplosternum littorale (tamoatá). 20 samples collected in the streams of the Sharp Community, Presidente Dutra and Ponte da Paraíba, in Manaus, Amazonas, were analyzed. These environments are polluted by effluents that are released into their waters. 1000 cells per slide were analyzed (n = 20,000 cells analyzed in total), from October to November 2022, they were analyzed in the multidisciplinary laboratory of the Centro Universitário do Norte - UNN, in the city of Manaus. 82 micronuclei were identified in the cells of the species sampled from the three streams. The individuals collected in the Sharp Community stream presented a much higher total of micronuclei, corresponding to 73.1% of the total damage, compared to individuals from other streams (Ponte Presidente Dutra 17.07% and Ponte da Paraíba 9, 7%). The quantity of micronuclei is qualitatively significant to indicate possible agents causing genotoxic damage to organisms present in these environments.

Keywords: Environmental contaminants. Micronucleus frequency. Genotoxicity. Mutagenicity.

Resumen: La prueba de micronúcleos (MN) es un análisis rápido y sencillo que detecta la presencia de daño genotóxico en el material genético de individuos expuestos a agentes clastogénicos. Esta prueba se há utilizado para medir el grado de exposición a contaminantes ambientales que causan efectos genotóxicos. Este estudio analizó la presencia de cambios genotóxicos, mediante la prueba de micronúcleos, en células de peces de la especie Hoplosternum littorale (tamoatá). Se analizaron 20 muestras recolectadas en los arroyos de la Comunidad Sharp, Presidente Dutra y Ponte da Paraíba, en

Manaos, Amazonas. Estos ambientes están contaminados por los efluentes que se vierten en sus aguas. Se analizaron 1000 células por portaobjetos (n = 20.000 células analizadas en total), de octubre a noviembre de 2022, fueron analizadas en el laboratorio multidisciplinario del Centro Universitário do Norte - UNN, en la ciudad de Manaus. Se identificaron 82 micronúcleos en las células de las especies muestreadas en las tres corrientes. Los individuos recolectados en el arroyo Sharp Community presentaron un total de micronúcleos mucho mayor, correspondiente al 73,1% del daño total, en comparación con los individuos de otros arroyos (Ponte Presidente Dutra 17,07% y Ponte da Paraíba 9,7%). La cantidad de micronúcleos es cualitativamente significativa para indicar posibles agentes que causan daños genotóxicos a los organismos presentes en estos ambientes**.**

Palabras-clave: Contaminantes ambientales. Frecuencia de micronúcleos. Genotoxicidad. Mutagenicidad.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade ambiental atualmente está comprometida pelo aumento da população humana, agricultura intensiva, industrialização e urbanização. A intensa exploração dos recursos naturais agravou significativamente os problemas ambientais (Ayanda *et al*., 2021), afetando tanto as águas superficiais quanto as subterrâneas e causando efeitos diretos ou indiretos nos organismos aquáticos, sejam eles alvo ou não-alvo (Ezeoyili *et al*., 2019).

O do acúmulo de resíduos sólidos em efluentes na capital do Estado do Amazonas, causa o transbordo em períodos de cheia, refletindo a falta de educação ambiental da população e uma gestão ambiental insuficiente por parte da gestão pública. Embora haja legislação que regulamenta o descarte correto dos resíduos sólidos, um exemplo disso é o Decreto n° 1.349 de 9 de novembro de 2011, que aprova o Plano Diretor Municipal de Resíduos Sólidos da cidade Manaus. Ele busca melhorar a infraestrutura de coleta e tratamento de resíduos, reduzindo sua geração e promovendo a reutilização, recuperação e reciclagem. Contudo, a falta de fiscalização e a não implementação prática resultam no acúmulo de resíduos nos igarapés, afetando diretamente a vida aquática e, consequentemente, os seres humanos (Decreto 1.349, 2011).

Nas últimas décadas, a industrialização e as diversas influências antropogênicas resultaram em uma maior presença de contaminantes em ecossistemas aquáticos (Sunjog *et al*., 2013). Isso ocorre pois o que é descartado contêm mistura de contaminantes orgânicos e inorgânicos, o que pode acarretar múltiplos efeitos biológicos, induzir alterações genéticas e influenciar a integridade de moléculas de DNA em organismos aquáticos, isso se dá pela interação com múltiplas sequências alvo nos organismos expostos (Kolarevic *et al*., 2017 & Thellmann *et al*., 2017). Uma das formas de identificar a presença de agentes genotóxicos é o teste do micronúcleo, uma técnica simples que oferece rápido resultado (Bueno *et al*., 2017). Micronúcleos são núcleos adicionais e separados do núcleo principal de uma célula, sua formação deve-se a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais, ou até mesmo falhas do fuso mitótico, estes podem ser únicos ou múltiplos (Rieger, 1968). Segundo Goes *et al.* (2016) a análise de alterações nucleares, como a presença de micronúcleos tem sido utilizada em pesquisas, com o objetivo de estimar os efeitos genotóxicos da exposição aos contaminantes ambientais.

A ocorrência de micronúcleos (MNs) é um fenômeno natural, mas a exposição à agentes genotóxicos elevam sua incidência nas células (Franco, 2012). O teste do micronúcleo tem sido empregado na análise da qualidade ambiental de corpos aquáticos, onde a maioria das pesquisas usam sangue periférico de peixes. Em um estudo realizado por Silva *et al.* (2019) cinco espécies de peixes que apresentaram maior abundância em três igarapés poluídos da cidade de Manaus-AM, foram escolhidas como organismos modelos,

sendo três amazônicos (*Pterygoplichthys pardalis, Hoplias malabaricus, Semaprochilodus insignis*) e duas exóticas (*Trichopodus trichopterus* e *Oreochromis niloticus*). Nas cinco espécies foram encontradas células micronucleadas e anormalidades nucleares eritrocíticas (ANEs). Os peixes possuem uma sensibilidade maior em relação às mudanças ambientais ou a agentes químicos presentes na água, servindo como bons indicadores (Gouveia *et al*., 2014). Ao analisar o eritrócito do sangue de peixe, e detectar a presença de micronúcleos, é possível avaliar que o indivíduo teve contato com contaminantes. Estes afetam o DNA tecidual, causando alterações genéticas que, predispondo ao desenvolvimento de câncer, podendo comprometer células gaméticas com subsequentes mudanças na dinâmica populacional (Bony *et al*., 2010).

Os peixes são considerados um modelo genético adequado para avaliação de alterações ambientais em ecossistemas aquáticos, devido a sua capacidade de metabolizar e acumular poluentes de forma eficiente (Hemalatha *et al*., 2021). Além de fornecer proteínas de alta qualidade, esses animais também são uma excelente fonte de nutrientes essenciais, como vitaminas A e D, selênio, iodo, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico (Chan *et al*., 2018).

Os peixes evoluíram num ambiente estável, por isso são muito sensíveis às mudanças em seu ambiente, pois os igarapés mantêm a temperatura da água estável (em condições preservadas) e as mudanças climáticas associadas ao desmatamento ou acúmulo de resíduos sólidos causam alterações nesses ambientes (Zanon, 2023). Os peixes desempenham papéis importantes na avaliação do risco potencial, associado à contaminação de novos produtos químicos no ambiente aquático (Ali *et al*., 2009).

A exposição ambiental de peixes a diversos poluentes genotóxicos pode ser avaliada observando-se os danos ao DNA, como MN em eritrócitos do sangue periférico (Obiakor *et al*. 2012). A utilização dos peixes como bioindicadores e dos micronúcleos como marcadores, permite-nos fazer uma avaliação precoce dos danos e os efeitos ambientais na saúde de organismos, populações e comunidades (Flores-Galván *et al*., 2020).

Hoplosternum littorale (Hancock, 1828), espécie de peixe popularmente conhecida como tamoatá, possui grande importância comercial na Venezuela e nas Guianas e serve como fonte de alimentação para a população ribeirinha do norte do Brasil, podendo ser encontrada em ambientes hostis (Rechi, 2017).

Na cidade de Manaus, capital do Amazonas, os igarapés vêm sofrendo com os efeitos da contaminação de resíduos sólidos e poluentes, o que vem refletindo na ictiofauna e na vida das pessoas que residem ali próximo. Diante disso, o objetivo desta pesquisa é identificar a ocorrência de micronúcleos em *Hoplosternum littorale* de igarapés de Manaus-AM e, por meio do teste do micronúcleo, avaliar a eficácia dessa técnica como um método rápido e prático.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área de estudo

Manaus, a capital do Estado do Amazonas, é cercada por cerca de 150 igarapés que cortam a cidade. Com o avanço da urbanização, eles vêm sofrendo com os impactos ambientais causados pela falta de preservação.

A espécie analisada é proveniente dos seguintes Igarapés: Ponte da Paraíba (5 amostras), localizada no bairro Adrianópolis, considerado classe alta, Ponte Presidente Dutra (5 amostras), localizada no bairro São Raimundo, classe baixa e Comunidade da Sharp (10 amostras), localizada na zona leste da cidade, bairro Armando Mendes, classe baixa. Todos os bairros residenciais, predominância de esgoto doméstico.

Figura 1 - Área de estudo: A- ponte Presidente Dutra; B- Ponte da Paraíba; C- Comunidade da Sharp-Manaus/AM



Fonte: imagem A: Amazonas atual, 2017; imagem B: Mongabay, 2020; imagem C: Valor amazônico.com, 2021.

2.2 Coleta e processamento das amostras

Um total de 20 exemplares da espécie *Hoplosternum littorale* (Figura 2) foram capturados em parceria com o Laboratório de Genética Animal (LGA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As coletas foram realizadas sob a permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO, número: 7634-1/2015). No laboratório, os exemplares foram eutanasiados, seguindo as Diretrizes da Prática da Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea, 2013), após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (n°. 011/2017) do INPA.

Figura 2- Exemplar de *Hoplosternum littorale* (tamoatá).



Fonte: Autores

2.3 Preparo de lâminas citológicas de sangue

O sangue dos exemplares foi coletado com o auxílio de um tubo capilar para hematócrito. Pingou-se uma gota de sangue de cada indivíduo em uma lâmina limpa, com o auxílio de outra lâmina limpa o sangue foi espalhado. Após sua secagem, cerca de 12 horas, as lâminas foram fixadas em etanol PA (100%) por 30 minutos, secas ao ar e posteriormente coradas com Giemsa 5 % (diluído em tampão fosfato pH 6,8) por 30 minutos. Estas foram lavada com água destilada e seca ao ar, em temperatura ambiente. As lâminas foram analisadas no

período de 13 de outubro a 30 de novembro de 2022, quanto à presença de micronúcleo. Estes foram identificados, seguindo o critério proposto por Fenech *et al.* (2003) e Freitas *et al.* (2005) sendo considerados como micronúcleos: partículas que não excediam 1/3 do diâmetro total do núcleo principal, não estavam conectados e nem ligados ao núcleo e permaneciam no citoplasma, formato redondo com bordas distinguíveis e mesma intensidade de coloração e refringência do núcleo principal.

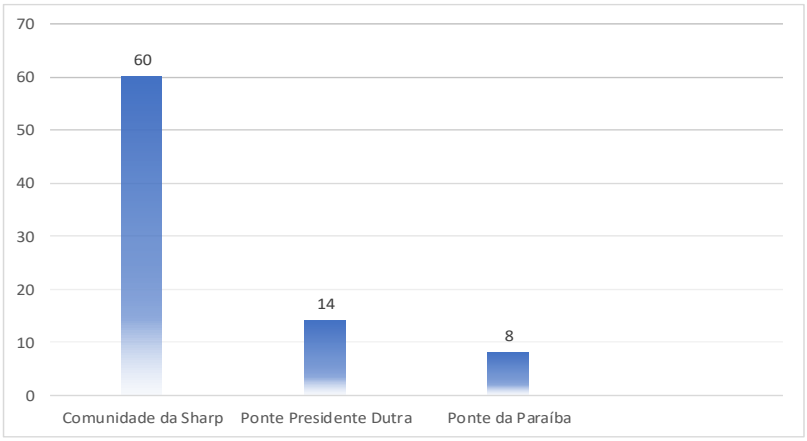
Foram analisadas um total de 20 lâminas (10 da Comunidade da Sharp; 5 Ponte da Paraíba e 5 Ponte Presidente Dutra), de cada lâmina 100 eritrócitos foram analisados, totalizando 20.000. A análise dessas células foi realizada no laboratório multidisciplinar do Centro Universitário do Norte (UNINORTE), Manaus, Amazonas. Para observação em microscópio óptico (Nikon; YS100), as lâminas receberam uma gota de óleo de imersão, utilizando objetiva com aumento de 100x, foram examinados mil (1000) eritrócitos por esfregaço sanguíneo e foram consideradas para a contagem dos eritrócitos aquelas amostras de melhor qualidade para visualização.

3 RESULTADOS

A incidência de micronúcleos presentes nos eritrócitos dos peixes analisados, foi de 82 MN no total, distribuídos por organismos dos três igarapés: Ponte da Paraíba 8 MNs/1.000 eritrócitos= 0,008 (0,8%); Pres. Dutra 14 MNs/1.000 eritrócitos= 0,014 (1,4%); Com. da Sharp 60 MNs/ 1.000 eritrócitos= 0,06 (6%).

Dentre as 20 lâminas analisadas, foi detectada em 12 delas a presença de MN (n = 82) em eritrócitos dos indivíduos provenientes dos igarapés de Manaus, mostrando que a exposição a possíveis agentes genotóxicos presentes na água desses ambientes, reflete diretamente nas células dessas espécies, resultando em alterações genéticas. A frequência de micronúcleos foi maior nos organismos da Comunidade da Sharp (Figura 3).

Figura 3 – Número de micronúcleos por igarapé (Manaus-AM).



Fonte: Autores

A elevada frequência se destacou nas amostras coletadas do igarapé da Comunidade da Sharp, mesmo os três igarapés usados como área de estudo sendo ambientes poluídos. O resultado dessas análises pode ser observado na Tabela 1, onde apresenta o n° da lâmina, sexo, tamanho, local de coleta e a frequência dos micronúcleos.

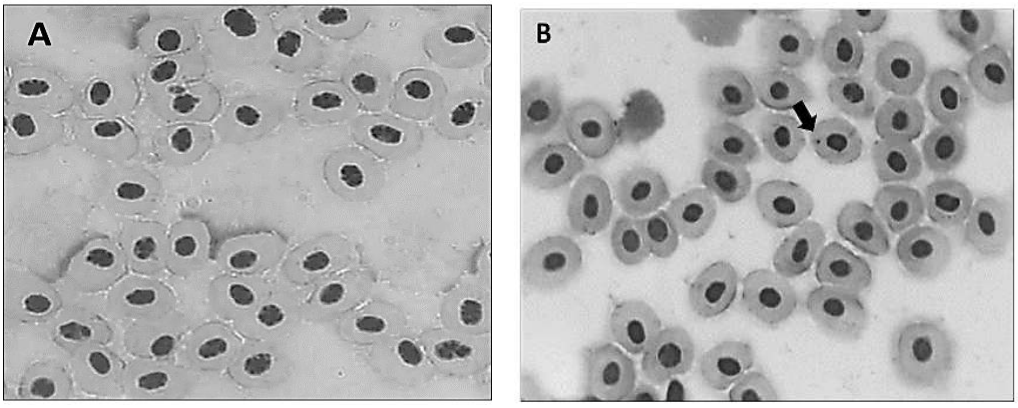
Tabela 1- Frequência de micronúcleos encontradas nas células de *Hoplosternum littorale* (Tamoatá) provenientes de igarapés de Manaus (AM).

Número Lâmina	Sexo	Tamanho	Ambiente (poluído)	Quantidade MN
1235	M	20,5 cm	Ponte da Paraíba	1
1237	F	22 cm	Ponte da Paraíba	6
1244	F	20,5 cm	Ponte da Paraíba	1
1199	juvenil	13 cm	Ponte Pres. Dutra	3
1201	juvenil	14,5 cm	Ponte Pres. Dutra	5
1220	-	-	Ponte Pres. Dutra	6
1261	M	21,5 cm	Com. da Sharp	35
1259	F	19,7 cm	Com. da Sharp	7
1263	M	17 cm	Com. da Sharp	7
1255	F	22,6 cm	Com. da Sharp	3
1258	M	21,5 cm	Com. da Sharp	7
1262	F	21,5 cm	Com. da Sharp	1

Fonte: dados coletados durante a pesquisa

Na Figura 3, são apresentados eritrócitos normais, provenientes de uma porção da lâmina 1244, Ponte da Paraíba e a presença de micronúcleos nos eritrócitos, lâmina 1261, da Comunidade da Sharp.

Figura 3- Eritrócitos de células de *Hoplosternum littorale* (Tamoatá) provenientes dos igarapés de Manaus (AM). **A**- Eritrócitos normais, sem MN, proveniente da ponte da paraíba; B- Eritrócitos com micronúcleos, em peixes da Comunidade da Sharp.



Fonte: Autores

No presente estudo, através do teste de MN foi possível identificar a presença de micronúcleos em células de sangue periférico de peixes coletados em igarapés da Comunidade da Sharp, Ponte da Paraíba e Ponte Presidente Dutra.

3.1 DISCUSSÃO

As pesquisas de genotoxicidade, realizadas em peixes evidenciam a importância desses organismos como bioindicadores ambientais. O teste do micronúcleo em peixes tem sido o biomarcador mais utilizado para avaliar a saúde dos ecossistemas aquáticos no Brasil (Dalzochio *et al*., 2016).

De acordo com Thomé *et al.* (2016), a frequência natural de micronúcleos de origem endógena, na espécie *Danio rerio* não ultrapassa o valor de 1 MN/1.000 células. Além dos micronúcleos, as células binucleadas, invaginadas e lobuladas, consideradas anormalidades nucleares, são biomarcadores citogenéticos de impacto ambiental.

Essas informações permitem afirmar que os peixes analisados nessa pesquisa apresentam evidentes alterações genotóxicas, possivelmente causadas por substâncias poluentes, presentes na água dos ambientes onde esses espécimes foram coletados, que podem ter causado danos no material genético do *Hoplosternum littorale*. A poluição aquática tornou-se um problema ambiental global, alguns produtos químicos presentes em efluentes industriais, agrícolas e domésticos são altamente tóxicos e, dependendo da dose e duração da exposição, podem causar sérios danos aos organismos aquáticos (Ali *et al*., 2019).

O teste do micronúcleo no monitoramento da poluição do Rio Tapajós, na cidade de Santarém, Pará demonstrou que a presença de poluentes no rio, acarretou alterações genéticas nas células dos peixes, evidenciado pela frequência de micronúcleos identificados. Na orla de Santarém, Pará os peixes apresentaram um número superior de micronúcleos nas células analisadas (31 e 54 MNs) em comparação ao ponto de controle (11 MNs) (Goes *et al.,* 2016).

A presente pesquisa aponta resultados positivos com a aplicação do teste de micronúcleo, e estão evidenciados nas alterações genotóxicas encontradas nos eritrócitos de *Hoplosternum littorale* (Tamoatá). Através desses dados foi possível comprovar a eficácia do teste de micronúcleo como indicador de danos citogenéticos. A presença dessas alterações em peixes de ambientes poluídos dos três igarapés (Comunidade da Sharp, Ponte Presidente Dutra e Ponte da Paraíba da cidade de Manaus, AM evidencia que a saúde desses ambientes está comprometida, podendo acarretar vários problemas para a biota aquática e para a comunidade local.

4 CONCLUSÃO

A presença de micronúcleos em eritrócitos de *Hoplosternum littorale* (tamoatá)**,** indica uma forte influência do papel do ambiente no material genético dos indivíduos ali existentes, resultando no aumento de alterações nucleares e consequentemente a formação de micronúcleos.

Consideramos que o teste do micronúcleo é capaz de detectar alterações genéticas humanas e através dessa pesquisa, foi possível evidenciar a importância desses seres aquáticos como bioindicadores ambientais, analisando e destacando também riscos aos ecossistemas e assim enfatizar a importância de cuidar do meio em que estamos para evitarmos mais danos a todos nós.

Conflitos de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse. Todos os autores estão cientes da submissão do artigo.

Contribuições dos autores

Os autores contribuíram significativamente para a realização e conclusão do estudo.

REFERÊNCIAS

Ali, D., Nagpure, N. S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B. & Lakra, W. S. (2009). Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do clorpirifós em peixes de água doce Channa punctatus (Bloch) utilizando ensaio de micronúcleos e eletroforese alcalina em gel unicelular. *Toxicologia Alimentar e Química*, 47 (4), 650-656.

Ali, H., Khan, E. & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metais. Environmental persistence, toxicity and bioaccumulation. *Hindawi Journal of Chemistry,* 14.

Ayanda, O., Tolulope, A. & Oniye, S. J. (2021). Mutagenicidade e genotoxicidade em juvenis de bagres africanos, Clarias gariepinus, expostos a formulações de glifosato e paraquat. *Progresso da ciência*, 104 (2), 1-15.

Bloching, M., Reich, W., Schubert, J., Grummt, T. & Sandner, A. (2008). Micronucleus rate of buccal mocosal epitelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral oncology*, 44, 220-226.

Bony, S., Gaillard, I. & Devaux, A. (2010). Avaliação da genotoxicidade de dois pesticidas de vinha em peixe-zebra. *Jornal Internacional de Química Analítica Ambiental*, 90 (3), 421-428.

Bueno, A. P. M. (2017). Teste de micronúcleos em peixes e parâmetros físico-químicos da água da represa Cocais, Minas Gerais. *Acta Brasiliensis*, Campina Grande, Paraíba, 1 (3), 32-36.

Chan, P. H. Y., Chan, M. H. M., Li, A. M., Cheung, R. C. K., Yu, X. T., & Lam, H. S. (2018). Methylmercury levels in commonly consumed fish and methylmercury exposure of children and women of childbearing age in Hong Kong, a high fish consumption community. *Environmental Research*, 166, 418–426. https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.033.

Dalzochio, T. (2016). The use of biomarkers to asses the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. *International aquatic research,* 8, 283-298.

Decreto 1.349 de 09 de novembro de 2011. (2011). Aprova o Plano Diretor Municipal de Resíduos Sólidos. Manaus, AM. Recuperado de www.manaus.am.gov.br/semulsp/legislacao/

Ezeoyili, I. C., Mgbenka, B. O., Atama, C. I., Ngwu, G. I., Madu, J. C. & Nwani, C. D. (2019). Alterações na acetilcolinesterase cerebral e biomarcadores de estresse oxidativo em bagres africanos expostos ao carbendazim. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(4), 371-379.

Fenech, M., Cheng, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. & Zeiger, E. (2003). Humn project: detailed descripition of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Researsh,* 534, 65-75.

Freitas, V. S., Lopes, M. A., Meirelles, J. R. C., Reis, L. C. & Eneida, M. M. (2005). Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Revista Baiana de Saúde Pública,* 29 (2), 189-199.

Flores-Galván, M. A., Daesslé, L. W., Arellano-García, E., Torres-Bugarín, O., Macías-zamora, J. V. & Ruíz-Campos, G. (2020). Genotoxicity in fishes environmentally exposed to as, Se, Hg, Pb, Cr and toxaphene in the lower Colorado River basin, at Mexicali valley, Baja California, México. *Ecotoxicology,* 29, 493-502.

Goes, I. M. C. (2016). Avaliação da poluição do rio Tapajós, no Município de Santarém - PA, através do teste do micronúcleo, utilizando peixes como bioindicador. *Revista Em Foco, Fundação Esperança/IESPES, Santarém,* 1 (23), 6-16.

Hemalatha, D., Nataraj, B., Rangasamy, B., Maharajan, K. & Ramesh, M. (2021). Explorando os efeitos genotóxicos subletais do inseticida organofosforado classe II quinalfos em peixes de água doce Cyprinus carpio. *Journal of Oceanology and Limnology*, 39, 661–670.

Kolarevic, S., Aborgiba, M., Kracun-Kolarevic, M., Kostic, J., Simonovic, P., Simic, V., Miloskovic, A., Reischer, G. (2017). Evoluation of Genotoxic Pressure along the Sava River. *PLoS ONE*, 11 (9), e0162450.

Obiakor, M. (2012). Eco-ecotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution. *JAnim Sci Adv,* 2 (1), 123-133.

Santos, V. T. F. (2015). *Frequência de micronúcleos em tambaquis de pisciculturas no município de Presidente Médici - RO*: influência de agrotóxicos. Monografia. Universidade Federal de Rondônia – UNIR.

Silva, F.A., Feldberg, F., Carvalho, N.D.M., Rangel, S.M.H., Schneider, C.H., Carvalho-Zilse, G.A., Silva, V.F., Gross, M.C. (2019ª). Effects of environmental pollution on the rDNAomics of Amazonian fish. *Environmental Pollution,* 252:180-187.

Sunjog, K., Kolarevic, S., Héberger, K., Gracic, Z., Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B. (2013). Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking diferences. *Anal Bioanal Chem*, 14: 4879-4885.

Thellmann, P., Kuch, B., Wurm, K., Kohler, H.R., Triebskorn, R. (2017). Water quality assessment in the "German River of the Years 2014/2015": how a casa study on the impacto f a storm water sedimentation basin displayed impairment of fish health in the Argen River (Southern Germany). *Environ Sci Eur* 29:10.

Thomé, R. G., Da Silva, P. M., & Dos Santos, H. B. (2016). Avaliação de Genotoxidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de Danio rerio. *Conexão Ciência (Online),* 11 (2), 9-16.