

FERNANDA GUEDES RODRIGUES MORO

**O USO DOS BIOMARCADORES DE
GENOTOXICIDADE NOS ESTUDOS DE
EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES QUÍMICOS
AMBIENTAIS**

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2010**

FERNANDA GUEDES RODRIGUES MORO

**O USO DOS BIOMARCADORES DE
GENOTOXICIDADE NOS ESTUDOS DE
EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES QUÍMICOS
AMBIENTAIS**

Monografia apresentada ao II Curso de Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do certificado de Especialista em Análises clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Leiliane C. A. Amorim

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2010**

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido viver esse momento.

Ao meu marido Gabriel, pelo amor e apoio de sempre.

A minha mãe Zenaide, que não poupou esforços para me acompanhar nas cansativas viagens durante todo o curso.

Ao meu irmão Fábio, por me receber em sua casa.

A minha orientadora Leiliane, pela paciência, disponibilidade, pelas explicações e profissionalismo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AMBIENTAL POR CONTAMINANTES QUÍMICOS	10
3 BIOMARCADORES	12
4 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	14
4.1 TESTE COMETA	16
4.2 TESTE DO MICRONÚCLEO	21
5 CONCLUSÕES	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE FIGURAS

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Imagem capturada de cometas em eritrócitos indicando quatro níveis de danos ao DNA, em que a “cabeça” do cometa representa o núcleo original e a “cauda”, os fragmentos de DNA | 17 |
| 2 | Linfócitos contendo micronúcleo, coloração Giemsa-Wright, aumento 1200x | 22 |

RESUMO

A identificação e a quantificação dos efeitos que os compostos químicos presentes no ambiente podem causar no ser humano são de grande importância para avaliação e prevenção do risco à saúde provocado pela exposição a esses agentes. Os biomarcadores são instrumentos que possibilitam a identificação de substâncias tóxicas ou seus metabólitos, assim como qualquer alteração bioquímica ou estrutural precoce que estime o risco da exposição a substâncias químicas. Com os biomarcadores de genotoxicidade avaliam-se os efeitos de uma variedade de substâncias descritas como carcinogênicas sobre os organismos. Nesse contexto, enquadram-se o Teste Cometa e o Teste do Micronúcleo, nos quais os danos causados ao DNA são determinados por meio da análise de células.

Palavras-chave: Exposição aos contaminantes químicos ambientais; biomarcadores de genotoxicidade; Teste Cometa; Teste do Micronúcleo.

ABSTRACT

The identification and quantification of the effects that chemicals present in the environment can cause in humans are of great importance for the assessment and prevention of health risk caused by exposure to these agents. Biomarkers are tools that enable the identification of toxic substances or their metabolites, as well as any early biochemical or structural change which estimate the risk of exposure to chemicals. Biomarkers of genotoxicity evaluate the effects of a variety of substances on the bodies which are described as carcinogenic. In this context, falls into the Comet assay and the Micronucleus Test, which assess damage to DNA caused by these chemicals.

Key-words: Exposure to environmental chemical contaminants; biomarkers of genotoxicity; Comet Assay; Micronucleus Test.

1. INTRODUÇÃO

A relação entre a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento pode ser analisada com base em diferentes pontos de vista. O homem tem, cada vez mais, consciência do impacto do desenvolvimento sobre o ambiente e sobre a vida no planeta. No processo de sua evolução, o homem desenvolveu tecnologias que trouxeram (e trazem, já que se trata de um processo contínuo) tanto benefícios quanto riscos à saúde humana e de outros seres vivos (DUVAL, 1998).

No Brasil, o perfil epidemiológico da população apresenta grave situação socioambiental pela falta de ações governamentais nas áreas de saúde ambiental e desenvolvimento urbano (DUVAL, 1998). Os modelos econômicos não levam em conta, prioritariamente, a saúde e o ambiente. Padrões de desenvolvimento não sustentáveis favorecem a degradação ambiental e afetam a saúde humana ao gerar conflitos de ordem política e cultural, além dos de ordem ambiental e tecnológica. Superar esses conflitos requer a elaboração de novas políticas e estratégias, assim como o estabelecimento de prioridades, definição de indicadores e tomada de decisões (TAMBELLINI et al., 2005).

Em tal contexto, faz-se necessário revisar alguns conceitos como o de “saúde ambiental” que, de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS) compreende os aspectos da saúde humana, incluindo a qualidade de vida, que são determinados por fatores físicos, químicos, biológicos, sociais e psicossociais do ambiente (TAMBELLINI et al., 2005).

O campo da saúde ambiental compreende a área da saúde pública que tem como um de seus objetivos a prevenção dos danos à saúde causados por contaminantes químicos presentes no meio ambiente, fazendo com que os níveis desta exposição sejam mantidos em valores que não constituam um risco. Para isso, tornam-se necessárias a identificação e a quantificação desse risco por meio da avaliação ambiental e/ou biológica da exposição humana (AMORIM, 2003). No entanto, o estabelecimento de umnexo causal considerando o ambiente e sua relação com os possíveis danos à saúde não é uma tarefa simples devido às inúmeras exposições a que os seres humanos são submetidos diariamente. O estudo desta relação é um

desafio devido à complexidade relacionada aos contaminantes químicos presentes no ambiente e suas possibilidades de interação (AZEVEDO & CHASIN, 2004).

A Toxicologia constitui um campo do conhecimento importante para as ações de vigilância em saúde ambiental. Enquanto ciência, ela tem como objeto de estudo a substância química, o sistema biológico e os efeitos tóxicos decorrentes das interações dessas substâncias químicas com o organismo. E ainda tem como objetivo gerenciar o risco como condição indispensável para o estabelecimento de normas de segurança na utilização e exposição a tais substâncias.

A Toxicologia Ambiental é uma área da Toxicologia relacionada aos estudos acerca da contaminação química do meio ambiente (água, ar, solo) e seus efeitos sobre a saúde humana. Dessa forma pode contribuir para a prevenção e diagnóstico das intoxicações por meio do desenvolvimento de métodos analíticos e o estabelecimento de biomarcadores para avaliação da exposição ambiental. Isto é feito por meio de estudos dos agentes químicos mais comuns no ambiente e do conhecimento das propriedades físico-químicas, toxicocinética e do mecanismo de ação tóxica, a fim de se relacionar a dose interna à exposição externa (WHO, 1993).

Os biomarcadores podem ser utilizados para confirmar a exposição dos indivíduos a determinada substância e servem de base para a avaliação individual ou de grupos da população exposta aos produtos químicos, fornecendo complemento à análise da adequação de medidas de proteção (WHO, 1993).

Entre os efeitos que mais despertam preocupação nos investigadores da área de saúde ambiental, encontram-se os relacionados com aspectos genéticos. Muitos grupos de pesquisa em diferentes países têm se dedicado aos estudos de avaliação do risco genotóxico de populações expostas ocupacional e ambientalmente, de acordo com suas características genéticas e metabólicas. Entretanto, das diferentes substâncias químicas, apenas pequena parcela vem sendo testada para se identificar seus reais efeitos nos seres vivos (PAVANELLO & CLONFERO, 2000).

Os biomarcadores de genotoxicidade são uma importante ferramenta nos estudos de exposição às substâncias mutagênicas que, por meio do desenvolvimento e da aplicação de técnicas, tornam possível o esclarecimento da relação entre os agentes químicos e sua toxicidade ao material genético – além de serem promissores na detecção preventiva de eventos adversos, mesmo aqueles tardios, como exemplo, os efeitos carcinogênicos.

2. IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AMBIENTAL POR CONTAMINANTES QUÍMICOS

Não é de hoje que o homem vem desenvolvendo produtos e tecnologias que resultam no lançamento de agentes químicos na forma de dejetos industriais, domésticos e agrícolas ao meio ambiente, contaminando os sistemas e a biota terrestre e aquática. Em contrapartida, ele cria recursos para tentar freá-los ou, se possível, revertê-los, elaborando métodos para a avaliação do nível de prejuízo sofrido pelo ambiente (BRILHANTE & CALDAS, 1999).

Como resultado da atividade humana, o ecossistema está constantemente exposto a diversas substâncias tóxicas provenientes de inúmeras fontes de emissão. Na biota aquática, por exemplo, pode-se encontrar descarga de lixo tóxico proveniente de efluentes industriais, processos de drenagem agrícola, derrames acidentais de lixo químico e esgotos domésticos lançados em rios e mares, que contribuem para a contaminação com uma variedade de agentes tóxicos, como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos, entre outros.

A avaliação da exposição humana a contaminantes químicos e a epidemiologia ambiental são dois componentes importantes para a avaliação de risco, que, refere-se à probabilidade de ocorrência de um determinado evento adverso (BRILHANTE & CALDAS, 1999).

Assim, têm-se diferentes elementos de investigação como: identificação do perigo e a capacidade de esta substância causar efeitos adversos; revisão de estudos existentes relacionados aos efeitos potenciais do perigo sobre a saúde e a relação dose-resposta para cada efeito; e avaliação da exposição e caracterização do risco (WHO, 1999).

Estudos sobre a toxicidade das substâncias químicas são de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação e permite avaliar o impacto e o efeito sobre células, tecidos e órgãos, além de se poder inferir sobre possíveis perturbações metabólicas. Associados aos estudos de toxicidade, a avaliação ambiental e biológica de populações expostas às substâncias

químicas ambientais são estratégias de proteção e prevenção dos efeitos nocivos que podem impactar a saúde humana (PANDRANGI et al., 1995; ANGERER et al., 2007).

A monitorização ambiental (MA) avalia possíveis riscos à saúde causados pela exposição à substância química presente no ambiente, pela medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar, água e solo. A monitorização biológica (MB) é complementar à MA e também avalia os possíveis riscos à saúde pela medida de parâmetros biológicos no indivíduo ou população exposta. Os parâmetros biológicos significam os biomarcadores, os quais podem corresponder à medida da substância química ou seus metabólitos em vários meios como urina, sangue, ar expirado, etc.; ou a detecção precoce de efeitos não adversos e reversíveis (AMORIM, 2003).

Na monitorização biológica consideram-se todas as fontes de exposição e rotas de absorção, como oral, cutânea e respiratória, podendo-se avaliar a exposição global do indivíduo ou população, levando em consideração as diferenças interindividuais ou grupos da população sob maior risco e mais vulneráveis à exposição a agentes químicos presentes no ambiente. As crianças, por exemplo, são mais vulneráveis do que os adultos, pois respiram maior quantidade de ar por unidade de peso corporal; e os idosos, por suas características fisiológicas, apresentam limitações causadas pelo desgaste da idade e debilidades no sistema homeostático (MELLO-DA-SILVA & FRUCHTENGARTEN, 2005; ANGERER et al., 2007)

Estimar a exposição e associar os efeitos à saúde e aos limites de segurança pode ser uma forma de determinar se é necessário ou não uma intervenção para proteger e promover a saúde, assim como estabelecer quais formas de intervenção serão mais eficazes (WHO, 2000). E os biomarcadores constituem uma importante ferramenta para este propósito.

3. BIOMARCADORES

O biomarcador é toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce que possa ser determinada nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, e que avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde. O processo de seleção e validação dos indicadores biológicos requer cuidado em relação à especificidade e sensibilidade, assim como a medida da exposição e a manifestação dos efeitos observados. Para que uma substância química, seu metabólito, ou uma alteração biológica sejam propostas como biomarcadores, é desejável que apresente as seguintes características (WHO, 1993):

- a quantificação do indicador deve: refletir a interação do sistema biológico com a substância química; ter conhecida e apropriada sensibilidade e especificidade para a interação e ser reprodutível qualitativa e quantitativamente;
- estar contido em um meio biológico acessível à análise, considerando a necessidade de manutenção da integridade da amostra entre a coleta e o procedimento analítico e, de preferência, não invasivo;
- a medição analítica deve apresentar exatidão e precisão adequadas;
- conhecer os valores normais do indicador em populações não expostas ao agente químico de interesse e as variações intra e interindividuais.

Os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: de efeito, de exposição e de suscetibilidade.

Os BIOMARCADORES DE EFEITO podem ser usados para documentar as alterações sub-clínicas que antecedem os efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição a uma substância química. Dessa forma, a relação entre os biomarcadores e a exposição contribui para estabelecer uma relação dose-resposta. Os biomarcadores de efeito podem ser definidos como alterações mensuráveis, de natureza bioquímica e/ou fisiológica, em um sistema biológico qualquer que, dependendo de sua magnitude, podem ser consideradas como sinalizadoras em potencial de um agravo à saúde ou mesmo de uma doença já estabelecida (WHO, 1993).

Geralmente, as alterações bioquímicas são consideradas como potencial fonte de indicadores biológicos de efeito. Se considerar que estas alterações precedem um dano estrutural, então a detecção dessas alterações permite a identificação precoce de uma exposição excessiva, podendo-se prevenir um efeito irreversível, ou seja, a doença. Tal estratégia é baseada na identificação das alterações bioquímicas precoces

e reversíveis que são indicadores sensíveis e específicos de uma resposta do organismo à exposição. A extensão à qual os biomarcadores vão prever uma resposta mais avançada (como doença ou risco de doença) requer, necessariamente, mais pesquisas e evidências em estudos epidemiológicos (AMORIM, 2003).

Os BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, a uma substância química, estabelecendo ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Os biomarcadores de exposição determinam a substância química ou seu metabólito em fluidos biológicos como sangue, urina, ar exalado, entre outros. Por serem capazes de quantificar a substância presente no organismo e refletirem a distribuição desta nos vários sítios biológicos são identificados como indicadores de dose interna (ANGERER et al., 2007).

Os BIOMARCADORES DE SUSCETIBILIDADE indicam a habilidade própria ou adquirida de um organismo em responder à exposição a uma substância química específica, que inclui mudanças nos receptores que alteram a suscetibilidade de um organismo a essa exposição, e fatores externos, como etnia, idade, dieta e estilo de vida. O princípio básico dos marcadores de suscetibilidade reside nas diferenças interindividuais, que conferem diferentes graus de sensibilidade às doenças causadas pelo ambiente. Esses marcadores podem incluir características genéticas, diferenças metabólicas ou a capacidade diferencial de um órgão se recuperar de agressões ambientais (WHO, 1993).

O uso dos biomarcadores tem caráter preventivo, ou seja, quando ainda não existe dano à saúde ou uma exposição excessiva (AMORIM, 2003).

Alguns indicadores biológicos de efeito possibilitam a avaliação da ação de uma substância química no órgão-alvo (ou sítio crítico) a partir da medida de uma alteração biológica associada a esta ação. No entanto, essa medida pode ter como limitação a dificuldade de acesso a certos tecidos do organismo. Embora sejam parâmetros importantes para prevenir possíveis efeitos nocivos à saúde, eles não são, na maioria, específicos para as substâncias químicas envolvidas e, por isto, requerem pesquisas com o propósito de sua validação. Entre os biomarcadores de efeito, considera-se os biomarcadores de genotoxicidade como uma ferramenta importante na prevenção dos efeitos nocivos de substâncias químicas que interagem com a molécula do DNA, os quais constituem o objeto desta monografia.

4. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE

Entre os biomarcadores de genotoxicidade pode-se incluir a análise da frequência de micronúcleos, anormalidades nucleares, quebras cromossômicas, quebras e alterações na fita de DNA e aductos de DNA, relativas à ligação covalente do agente químico-DNA, que tem como consequências problemas de replicação, transcrição e pareamento dessas moléculas.

A genotoxicidade refere-se à ação tóxica de compostos químicos que alteram o DNA em sua estrutura físico-química. Esses agentes causadores de danos no gene podem acarretar dois eventos distintos, um chamado “clastogenicidade”, no qual ocorre a alteração da disposição dos cromossomos; e “mutagenicidade”, no qual a alteração ocorre nas sequências de pares de bases do DNA. Tais agentes levam à alteração permanente no DNA ou à que se pode herdar da função gênica (DA SILVA et al., 2003).

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando aductos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na maioria dos casos, a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso a lesão seja fixada, provoca alterações hereditárias que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação (DRAGAN et al., 2001).

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Mas, nem sempre, uma mutação pode ser vantajosa e, na maioria das vezes, os resultados incluem má formação, câncer, envelhecimento e morte. Embora essas mutações possam ocorrer de forma espontânea, a maioria delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem e outros organismos podem ser expostos (HAYASHI et al., 2000; DA SILVA et al., 2003).

A formação de aductos no DNA pode servir como um biomarcador precoce para o câncer, doença que resulta de múltiplas alterações genéticas causadas por mutações herdadas nas células germinativas ou por mutações nas células somáticas e consequente crescimento desordenado de células. Assim, apesar do extenso e eficiente mecanismo de reparo celular do DNA, como ele está em constante replicação, podem ocorrer erros irreparáveis. Esses erros são raros, mas, se ocorrerem em um gene envolvido no processo carcinogênico, constituem o primeiro passo para a formação de um câncer. Um agente químico pode aumentar o risco dessa doença por

causar danos diretos ao DNA, por aumentar o número de replicações ou, ainda, pela combinação de ambos os processos (DRAGAN et al., 2001).

O agente químico capaz de formar um aducto no DNA e provocar tais danos, comumente referido como DNA-reativo, é também denominado como genotóxico; ao passo que, agentes capazes de potencializar a carcinogenicidade, devido ao aumento do número de replicações do DNA são considerados carcinógenos não mutagênicos (DRAGAN et al., 2001).

A detecção e a quantificação de danos genéticos são de interesse nos estudos toxicológicos ambientais, já que diversas substâncias lançadas ao ambiente são agentes causadores de mutações gênicas e de alterações cromossômicas que, ao afetarem os indivíduos, podem causar impactos drásticos ao interferirem no equilíbrio genético das populações, propiciando a vulnerabilidade dos organismos, o declínio da diversidade e até a possível extinção de espécies (DA SILVA et al., 2003).

Além do câncer, são inúmeros os distúrbios causados por compostos químicos, os quais foram objeto de muitos estudos toxicológicos recentes. Esses estudos apontam que metais como ferro, cobre e cromo produzem Espécies Reativas de Oxigênio. Estas e o estresse oxidativo gerado por essas substâncias induzem a peroxidação de lipídios, danificam o DNA e alteram a homeostasia de diversos minerais essenciais, podendo provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares. Além do mais, o estresse oxidativo afeta diversas rotas metabólicas, incluindo aquelas envolvidas no reparo de danos ao DNA, conhecidos como efeitos genotóxicos (STOHS & BAGCHI, 1995). No entanto, é importante considerar o fator “susceptibilidade” de cada indivíduo dentro da população quando ocorre exposição aos poluentes ambientais.

Diversas metodologias que detectam o potencial genotóxico fornecem uma caracterização dos possíveis riscos para a saúde humana, pois por intermédio de testes citogenéticos é possível avaliar os efeitos mutagênicos de um determinado agente químico. A função primária dos biomarcadores de genotoxicidade é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos que induzem mutações nas células somáticas ou que possam ser transmitidos às futuras gerações (DA SILVA et al., 2003)

Os testes para avaliar a genotoxicidade decorrente de uma exposição química mostraram grande avanço na última década. Diversas técnicas para determinação de parâmetros biológicos em várias espécies (desde bactérias a seres humanos) têm sido

propostas como biomarcadores de efeito de genotoxicidade. Entre os marcadores genéticos, a análise da frequência de micronúcleos, anormalidades nucleares, quebras cromossômicas, formação de aductos e quebras e alterações na fita de DNA são os mais usados no estudo de substâncias genotóxicas (BORRAS & NADAL, 2004). No nível celular são utilizados, mais frequentemente, dois tipos de biomarcadores de genotoxicidade como indicativos de dano ao material genético: o Teste Cometa e o Teste do Micronúcleo.

4.1 TESTE COMETA

O Teste Cometa, também conhecido como Ensaio Cometa, pode ser classificado como eletroforese em microgel, cujo método é realizado para medir o dano ao DNA. Este método baseia-se no comportamento do DNA em células individualizadas, levando em conta sua organização dentro do núcleo e o nome cometa refere-se à formação de uma cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (TICE et al., 2000). O resultado pode ser visualizado ao microscópio conforme a Figura 1.

Para ser compactado, após seu envelopamento, o DNA forma alças que se aderem a uma parede protéica. Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupará o espaço no gel antes preenchido por toda a célula, permanecendo retido numa estrutura chamada nucleóide. Caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudanças, formando um halo (ROJAS et al., 1999).

RYDBERG & JOHANSON (1978, citados por OSTLING & JOHANSON, 1984), desenvolveram a primeira quantificação de dano ao DNA em células individuais, embebidas em agarose sobre lâminas de microscopia e lisadas em condições alcalinas. Após a neutralização, as células eram coradas com laranja de acridina e a extensão do dano do DNA era quantificada com auxílio de um fotômetro, pela medida da proporção de fluorescência verde, que indicava a fita dupla de DNA e, por vermelho, que indicava a fita simples de DNA.

Seis anos depois, OSTLING & JOHANSON (1984) descreveram um procedimento para a visualização direta do dano no DNA. Desta vez, as células individualizadas eram

lisadas por detergentes e sais em altas concentrações, submetidas à eletroforese sob

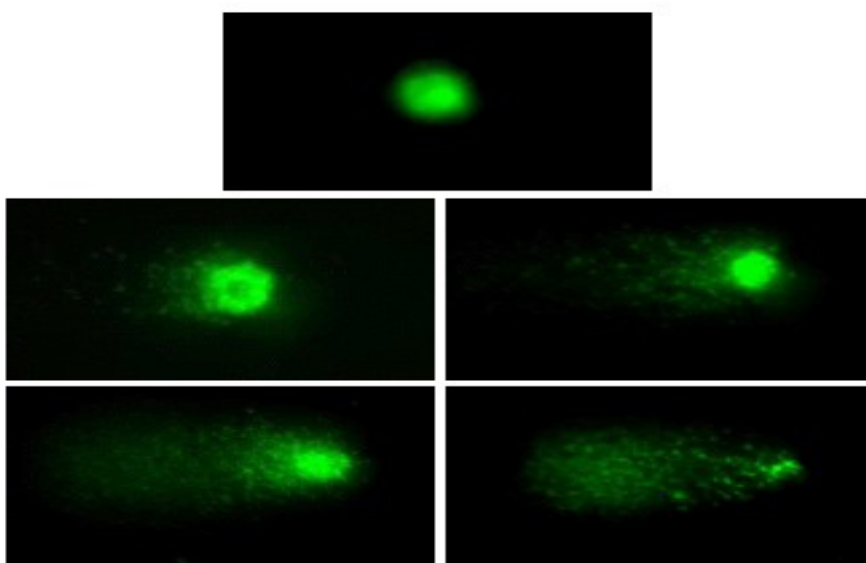


Figura 1 - Imagem capturada de cometas em eritrócitos indicando quatro níveis de danos ao DNA, na qual a “cabeça” do cometa representa o núcleo original e a “cauda”, os fragmentos de DNA.

condições neutras e coradas com um ligante de DNA fluorescente. Durante a eletroforese, as quebras e os fragmentos migravam do núcleo. Os resultados foram imagens com a aparência de um cometa e sua cauda utilizada para determinar a extensão de dano ao DNA. O método original neutro pareceu ser sensível para medir mudanças na helicoidização do DNA que resultam de quebras simples, mas as condições de lise foram ineficazes para a remoção de todas as proteínas. SINGH et al.

(1988) adaptaram o procedimento para condições alcalinas, que permitiu a detecção de quebras duplas e também de quebras simples.

O Teste Cometa consiste, basicamente, das etapas de preparação da suspensão celular, incubação em solução de lise, desespiralização do DNA e corrida eletroforética. A lise, no Teste Cometa, tem como finalidade remover os conteúdos celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de uma pequena quantidade de proteínas não histônicas (YENDLE et al., 1997).

Este é considerado um teste simples, rápido e sensível, capaz de detectar uma quebra em 1×10^{10} Daltons, tendo a vantagem de utilizar qualquer célula nucleada eucariótica. Contudo, um dos maiores problemas da técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica e não pode ser relacionada diretamente com a genotoxicidade de um agente químico, já que as quebras no material genético podem ocorrer por diversos mecanismos como radiação ionizante, ativação de enzimas como as endonucleases e as topoisomerasas, elevados níveis de compostos reativos endógenos como radicais superóxidos e óxido nítrico, entre outros (MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998).

Ao contrário de outros tipos de ensaios como o Teste de Micronúcleo, que precisa de células em proliferação para sua viabilidade, o Teste Cometa não necessita dessa condição, podendo ser realizado com células normais, geralmente, com eritrócitos, pois são obtidos facilmente por meio de coleta de sangue. Além disso, o sangue apresenta a vantagem de apresentar em sua composição aproximadamente 97% de eritrócitos nucleados e apenas cerca de 3% de leucócitos, o que lhe confere alta homogeneidade. Porém, outros tecidos, como o fígado e os rins, também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes podem ser muitas vezes específicos para determinados tecidos no organismo (MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998).

Uma variedade de células normais e transformadas, provenientes das espécies humana, animal e vegetal são usadas em estudos *in vitro*. Na maioria dos trabalhos com células humanas usam-se leucócitos e linfócitos, mas outros tecidos também são empregados, como células epiteliais (córnea, bucal, nasal e mucosa gástrica, cutâneas e subcutâneas), reprodutoras, do cólon, do fibroblasto neonatal, pancreáticas, de adenocarcinoma e linfóides (ROJAS et al., 1999).

O Teste Cometa é utilizado como uma ferramenta importante para avaliar a genotoxicidade de substâncias químicas através da integridade do DNA e no reparo e recuperação em diferentes espécies. Três principais vantagens são identificadas para

realização desse teste: (i) qualquer tipo de tecido com células nucleadas pode ser usado, (ii) são necessárias pequenas quantidades de amostras e (iii) o ensaio é rápido, sensível e barato. No entanto, uma dificuldade importante no uso do Teste Cometa em trabalhos ambientais são os diferentes métodos de quantificação do dano – que podem tomar como parâmetro tanto o tamanho da cauda com relação ao núcleo quanto a porcentagem de fragmentação da cauda, ou ambos (BELPAEME et al., 1998). A variabilidade dessas medidas ainda é um desafio para especialistas, pois a interpretação de limites ideais pode impedir a detecção de pequenos efeitos genotóxicos, podendo conduzir a conclusões equivocadas na estimativa do risco da exposição aos contaminantes.

Entre os diversos estudos encontrados na literatura, ANDERSON et al. (1998) avaliaram mais de 200 agentes químicos a partir de dados utilizando o Teste Cometa. Para 119 agentes químicos foram disponibilizados dados relacionados à carcinogenicidade e para 95 foram identificados na literatura estudos empregando Teste Cometa. Entre os 95 agentes químicos, 84 estavam associados ao efeito de carcinogenicidade, levando à prevalência de 88% (84/95). De acordo com dados da literatura, entre os 84 carcinogênicos, 74 tiveram resultado positivo para o Teste Cometa (sensibilidade), numa proporção de 88% (74/84). Entre os 11 agentes não carcinogênicos, 7 deles tiveram o Teste Cometa negativo (especificidade), numa proporção de 64% (7/11). Nessa análise não se levou em consideração as diferenças entre os ensaios *in vitro* e *in vivo*, as diferentes espécies, órgãos ou diferentes tecidos que foram utilizados nos diversos estudos disponíveis na literatura. No entanto, os autores puderam concluir que o Teste Cometa tem alta sensibilidade para carcinogênicos, mas sua especificidade é ainda incerta devido ao pequeno número de não carcinogênicos que já foram testados.

BÖCKER et al. (1999) desenvolveram um estudo para automatizar o Teste Cometa visando a possível padronização. Os autores afirmaram que as análises realizadas de forma analógica são imprecisas devido à subjetividade do observador ao visualizar as medidas dos cometas. Como consequência disto, têm menor uniformidade e baixa reprodutibilidade em diferentes laboratórios. Neste estudo, a análise da imagem foi dividida em duas partes: na primeira, o reconhecimento automático de células e a classificação do cometa; e, na segunda, a quantificação dos parâmetros de cometas desejados. Na comparação das medições feitas nas mesmas amostras por análise de sistemas manuais e automatizados não existem diferenças

significativas, mas demonstrou-se a possibilidade da automação da análise como fator de redução de subjetividade e maior rapidez no processo de classificação.

TARANTINI et al. (2009) estudaram a genotoxicidade do benzo [a] pireno (B [a] P), um hidrocarboneto aromático policíclico produzido na combustão incompleta de matéria orgânica e carcinogênico para humanos. O interesse dos autores era avaliar duas vias propostas para explicar a genotoxicidade de B [a] P, as quais são: a indução de lesão oxidativa e a formação de aductos no DNA. O composto foi avaliado puro ou em misturas, utilizando hepatócitos humanos por meio do Teste Cometa. Foi feita uma comparação entre a extensão de quebras na fita de DNA determinadas pelo teste e do número de aductos de DNA formados pelo metabólito epóxido diol de B [a] P, o qual foi determinado por espectrometria de massa. As culturas de hepatócitos humanos foram tratadas tanto com partículas de B [a] P puro quanto com as extraídas de amostras de ar coletadas nos sítios urbanos e industriais de metalúrgicas, supostamente misturadas a outros compostos químicos.

O tratamento com B [a] P puro não induziu aumento nas medições da cauda do cometa pelo teste numa concentração abaixo de 1 μM enquanto aductos foram observados para concentrações abaixo de 0,025 μM . Resultados muito diferentes foram obtidos a partir das amostras ambientais urbanas e industriais que identificaram aumento nas medições da cauda pelo Teste Cometa em misturas contendo 0,16 μM de B [a] P. Este fato permitiu aos autores do trabalho concluir que a indução de quebras na fita de DNA resultou da ação de outros componentes das amostras, o que implica uma questão de saúde pública, pois a população em geral raramente está exposta a substâncias químicas puras, mas sim, a misturas complexas. Os dados obtidos mostraram que uma combinação de métodos analíticos e o uso de abordagens complementares são recomendados para avaliar a genotoxicidade de misturas complexas; e a avaliação do risco deve considerar a presença de substâncias tóxicas que são potencializadas entre si e têm sua propriedade genotóxica modulada por outras moléculas presentes na mistura.

STOCKS et al. (2010), em estudo sobre células espermatogênicas, descreveram que, aproximadamente, um terço dos casos de fertilização *in vitro* no Reino Unido são atribuídos à infertilidade masculina e que, na maioria dos casos, a origem da infertilidade é desconhecida. Baseados na importância da integridade do DNA do espermatozoide para o sucesso da reprodução assistida, eles investigaram a formação do aducto N7-metildeoxiguanosina (N7-MedG) de DNA em células reprodutoras

masculinas. A formação deste aducto serve como um biomarcador de efeito a agentes alquilantes de DNA. Os agentes alquilantes são agentes químicos biologicamente potentes que causam toxicidade celular, com resultados adversos na reprodução e cânceres.

A pesquisa foi feita entre novembro de 2005 a setembro de 2006, com 97 homens, com idades entre 25 e 50 anos, cujas mulheres estavam em tratamento de fertilização *in vitro*. A intenção era avaliar a relação entre a formação desse aducto e a infertilidade desses casais. Os homens diagnosticados com fator de infertilidade tinham níveis médios de N7-MedG mais elevados no DNA de suas células reprodutoras. Embora a interpretação dos resultados seja limitada pela pequena dimensão do estudo, os dados obtidos sugerem uma associação entre a exposição a agentes alquilantes de DNA e a infertilidade masculina, mostrando que a medição dos níveis N7-MedG pode ser um instrumento útil de diagnóstico e prognóstico ao fator de infertilidade masculina. No entanto, a partir desse estudo, os autores concluíram que a medida do N7-MedG por meio do método utilizado exigiu grande quantidade de DNA (> 4,2 µg) em comparação com outros métodos de medida de dano ao DNA, como o Teste Cometa.

Baseados nesse fato, estudos dos resultados em reprodução assistida sobre o efeito de danos no DNA utilizando o Teste Cometa foram feitos no intuito de associar diferentes taxas de fertilização, qualidade embrionária e taxas de gravidez. Os autores dessa pesquisa confirmaram a idéia de MITCHELMORE & CHIPMAN (1998) em relação às vantagens do Teste Cometa que inclui sua simplicidade e um número reduzido de células e à desvantagem da não atribuição a uma exposição específica.

4.2 TESTE DO MICRONÚCLEO

Outro parâmetro biológico para avaliar o efeito genotóxico de contaminantes químicos são os micronúcleos (MN). Sendo o respectivo teste usado como biomarcador de genotoxicidade, uma vez que está associado a aberrações cromossômicas. Os micronúcleos são corpúsculos similares em estrutura ao núcleo (Figura 2), constituídos de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Resulta de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. São formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Sendo

assim, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico (HAYASHI et al., 2000).

Por isso, os danos causados no DNA, quando da exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação deste biomarcador de efeito. Quando a membrana nuclear é refeita, o DNA serve de catalisador para se formar um completo envelope nuclear em torno dele. Por esta característica, qualquer fragmento ou cromossomo(s) inteiro(s) separados do núcleo principal, formam esse pequeno núcleo (HAYASHI et al., 2000).

Os eritrócitos, células abundantes na medula óssea e no sangue periférico são particularmente propensos a sofrer essa alteração por sua alta rotatividade, pela ausência de núcleo e a possibilidade de diferenciar eritrócitos jovens por causa da presença de RNA, que podem ser corados diferencialmente com o corante Giemsa (HAYASHI et al., 2000).

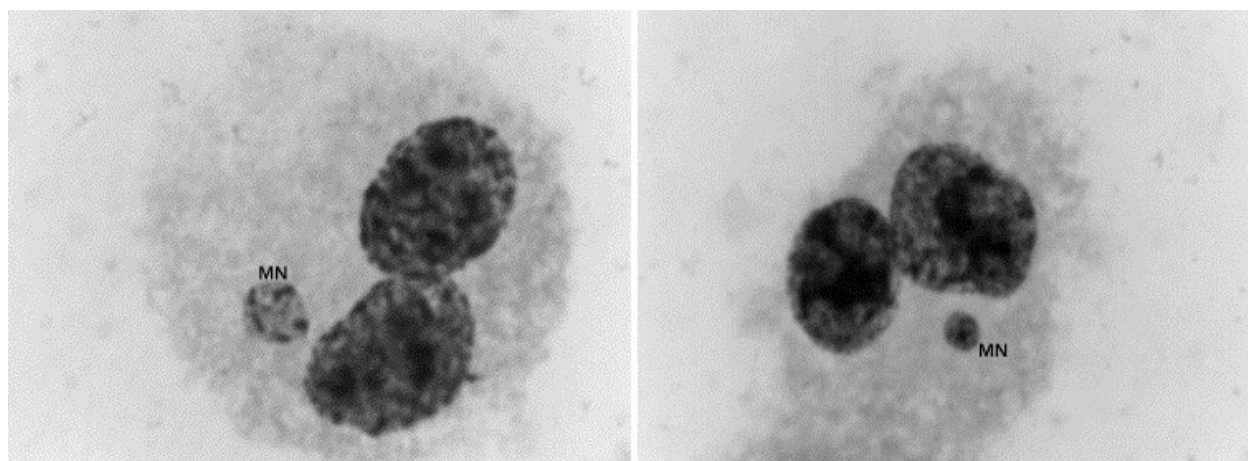


Figura 2 - Linfócitos contendo micronúcleo, coloração Giemsa-Wright, aumento 1200x.

Os micronúcleos são respostas em curto prazo decorrente da ação de uma substância genotóxica e sua expressão depende da intensidade da exposição, mas, de acordo com HEDDLE (2009), provavelmente, independe da duração de tal exposição. A espécie humana e outros organismos vivos expostos a essas substâncias tóxicas a partir da sua presença no ambiente poderão desenvolver deformações nucleares.

A análise de micronúcleos foi proposta por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975) como uma alternativa simples para se avaliar danos cromossômicos *in vivo* com

populações de células em divisão, tal como as da medula óssea. De acordo com FENECH et al. (2003) o Teste do Micronúcleo em medula óssea e sangue periférico é agora um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica, entretanto, não é uma técnica aplicada em outras populações de células *in vivo* e *in vitro*.

O Teste de Micronúcleo é indicado entre os testes de genotoxicidade pelas agências internacionais e instituições governamentais em medula óssea de roedores *in vivo* e amplamente aceito e recomendado para a avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (RIBEIRO et al., 2003).

O uso deste biomarcador tem sido recomendado para estudos de exposição ambiental para avaliar a genotoxicidade de uma variedade de substâncias, por sua capacidade de detectar tanto quebras cromossômicas quanto segregação cromossômica anormal. É tecnicamente mais simples, conduzido em menos tempo, com um resultado menos subjetivo e tem a possibilidade de análise por avaliação de imagem e citometria de fluxo. Tais propriedades o tornam bastante apropriado para testes toxicológicos de rotina (FENECH et al., 2003).

Em alguns estudos de avaliação do efeito genotóxico de substâncias de interesse ambiental foram utilizados os dois biomarcadores – Teste Cometa e Teste de Micronúcleo, buscando comparar os dois parâmetros.

CORONAS et al. (2009) investigaram os efeitos genotóxicos de materiais particulados presentes no ambiente a partir da análise de linfócitos humanos presentes em sangue periférico e na mucosa bucal. Foram coletadas amostras de pessoas que residem e/ou trabalham a favor do vento em uma refinaria de petróleo no Sul do Brasil. As análises foram feitas pelo Teste Cometa e Teste do Micronúcleo. O grupo exposto foi comparado a um grupo de referência de indivíduos que vivem em uma área urbana com tráfego limitado e influência industrial, localizada longe das principais áreas industriais. Todas as amostras de ar coletadas indicaram a presença de substâncias mutagênicas como NO₂ (dióxido de nitrogênio), O₃ (ozônio) e SO₂ (dióxido de enxofre). Por meio do Teste Cometa, o grupo exposto mostrou danos no DNA significativamente maiores em linfócitos que o grupo de referência. As frequências de micronúcleos na mucosa bucal foram muito baixas para ambos os grupos e nenhuma diferença entre os grupos foi observada. Os resultados indicam que, neste trabalho, o Teste Cometa foi um instrumento mais sensível que o Teste do Micronúcleo para detectar danos no DNA

em indivíduos expostos a contaminantes ambientais provenientes de uma refinaria de petróleo, além de detectar a atividade genotóxica dos agentes químicos presentes no local estudado.

KOEHLER et al. (2010) realizaram um estudo sobre os efeitos genotóxicos do dióxido de nitrogênio (NO_2), um composto gerado pelos escapamentos de veículos automotores, normalmente presente no ambiente e potencialmente tóxico para a saúde humana. No estudo utilizaram-se células do epitélio nasal de 10 indivíduos e essas células foram cultivadas e expostas a ar sintético com 0,01; 0,1; 1 e 10 ppm de NO_2 por meia hora. Após a exposição, as células foram avaliadas pelo Teste Cometa e de Indução de Micronúcleos. Nos experimentos foram constatados efeitos genotóxicos por fragmentação de DNA a partir de 0,01 ppm de NO_2 no Teste Cometa, ao passo que nenhuma indução de micronúcleo, nem alterações proliferativas foram observadas no Teste de Micronúcleos, não indicando danos permanentes ao DNA por meio deste teste. Com base nos dados adquiridos supôs-se uma possível genotoxicidade de NO_2 em concentrações urbanas em um teste de triagem, mas não se elucidou os efeitos da exposição prolongada a esse poluente ambiental.

GROVER et al. (2010) avaliaram a genotoxicidade do chumbo como um poluente ambiental e ocupacional por meio do Teste Cometa e do Teste de Micronúcleo. Foram avaliados ainda, biomarcadores de exposição e outros biomarcadores de efeito relacionados ao sistema hematopoiético, além da exposição associada ao stress oxidativo. O grupo de estudo foi composto de 90 indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo e 90 indivíduos do grupo controle não expostos ao chumbo. Os resultados indicaram que os indivíduos expostos tiveram uma alteração significativa no resultado do Teste Cometa em relação ao grupo controle. A análise dos micronúcleos nas células da mucosa epitelial e linfócitos do sangue periférico revelaram que existiu um aumento significativo na frequência de micronúcleos em indivíduos expostos quando comparados com o grupo controle.

Um aumento da proporção de mutação em células da mucosa bucal pode ser indicado por um aumento na frequência de micronúcleos e está relacionado com doenças da mucosa, tal como carcinoma. Neste sentido, CELIK et al. (2010) avaliaram a frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de 60 indivíduos, cuja profissão era pintores, os quais estão expostos a vários solventes. Entre este grupo havia 30 indivíduos fumantes e 30 indivíduos não fumantes. Este estudo teve como grupo controle 60 indivíduos sem exposição com a

mesma proporção de fumantes e não fumantes. Os resultados mostraram um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos nas células epiteliais bucal quando comparados com o grupo controle. Quando comparados os grupos de fumantes e não fumantes também foi evidenciada uma incidência maior de micronúcleos.

Semelhante estudo havia sido realizado por HALLARE et al. (2009) com o estudo da frequência de micronúcleos em células da mucosa oral em indivíduos expostos à gasolina. Foram avaliados 18 indivíduos frentistas de postos de gasolina comparados com um grupo controle. Os resultados mostraram uma incidência de micronúcleos no grupo de indivíduos expostos significativamente maior que no grupo controle. Nenhuma relação entre a frequência de micronúcleos e algum outro fator como idade, hábito de fumar, uso de álcool e período de trabalho foi observada.

5. CONCLUSÕES

É realmente necessário conhecer o impacto das substâncias genotóxicas sobre a saúde humana. Isso tem sido objeto de inúmeros estudos em que se busca caracterizar tais efeitos num estágio precoce para que se possa prevenir um dano definitivo ou irreversível. O uso dos biomarcadores de genotoxicidade em diferentes estudos tem mostrado um enorme potencial, sobretudo para as substâncias químicas encontradas no meio ambiente em geral.

A biomonitorização é uma importante ferramenta para o estudo da avaliação de risco às substâncias genotóxicas presentes no ambiente, seja ocupacional ou ambiente geral. A partir dos resultados encontrados nesses estudos é possível estabelecer valores-limites para a exposição química e normas ambientais que garantam maior integridade e segurança para a saúde humana. A definição desses valores-limites e os de referência devem ser adequados ao Brasil, levando-se em conta as diferenças intrínsecas da população e da exposição quando comparadas com outras partes do mundo.

Muitos estudos ainda são incompletos do ponto de vista da relação com o efeito (propriamente dito), a dose e as possíveis interações envolvidas no processo da ação genotóxica. Isso gera enorme dificuldade na interpretação dos resultados, principalmente devido ao desconhecimento de padrões de normalidade.

No entanto, a importância dos biomarcadores reside no fato de poderem ser aplicados em um grande número de substâncias químicas, fornecendo subsídios para decisões de caráter sanitário. Porém, há necessidade de se buscar mais informações sobre os efeitos dos diferentes contaminantes ambientais na saúde e melhorar a interpretação dos dados de biomonitoramento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Bras. Epidemiol.*, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.
- ANDERSON, D.; YU, T.W.; MCGREGOR, D.B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, v. 13, n. 6, p. 539-555, 1998.
- ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, v. 210, n. 3, p. 201-228, 2007.
- AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2004. 340 p.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat. Res.-Genetic.Toxicol. Environ. Mutagen.*, v. 415, n. 3, jul., p.167-184, 1998.
- BÖCKER, W.; ROLF, W.; BAUCH, T.; MÜLLER, W.-U.; STREFFER, C. Automated comet assay analysis. *Cytometry (A)*, v. 35, n. 2, p. 134-144, 1999.
- BORRAS, M.; NADAL, J. Biomarkers of genotoxicity and other end-points in an integrated approach to environmental risk assessment. *Mutagenesis*, v. 19, n. 3, p. 165-168, 2004.
- BRILHANTE, O.M.; CALDAS, L.Q.A. *Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1999. 155 p.
- CELIK, A.; DILER, S.B.; EKE, D. Assessment of genetic damage in bucal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index. *DNA Cell Biol.*, v. 29, n. 6, p. 277-284, 2010.
- CORONAS, M.V.; PEREIRA T.S.; ROCHA, J.A.V.; LEMOS, A.T.; FACHEL, J.M.G.; SALVADORI, D.M.F.; VARGAS, V.M.F. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environ. Int.*, v. 35, n. 7, p. 1023-1029, 2009.
- DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento ambiental. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003, v. 1, p. 167-178.
- DRAGAN, Y.P.; BIDLACK, W.R.; COHEN, S.M.; GOLDSWORTHY, T.L.; HARD, G.C.; HOWARD, P.C.; RILEY, R.T.; VOSS, K.A. Implications of apoptosis for toxicity,

- carcinogenicity, and risk assessment: Fumonisin B1 as an example. *Toxicol. Sci.*, v. 61, n. 1, maio, p. 6-17, 2001.
- DUVAL, G. Salud y ambiente en el proceso de desarrollo. *Ciênc. Saúde Col.*, Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p. 7-16, 1998.
- FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.-Genetic.Toxicol. Environ. Mutagen.*, v. 534, n. 1-2, jan., p. 65-75, 2003.
- GROVER, P.; REKHADEVI, P.V.; DANADEVI, K.; VUYYURI, S.B.; MAHBOOB, M.; RAHMAN, M.F. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, v. 213, n. 2, p. 99-106, 2010.
- HALLARE, A.V.; GERVASIO, M.K.; GERVASIO, P.L.; ACACIO-CLARO, P.J. Monitoring genotoxicity among gasoline station attendants and traffic enforcers in the City of Manila using the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells. *Environ. Monit. Assess.*, v. 156, n. 1, p. 331-341, 2009.
- HAYASHI, M.; TICE, R.; MACGREGOR, J.T.; ANDERSON, D.; BLAKEY D.H.; KIRSHVOLDERS, M.; OLESON Jr., F.B.; PACHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.-Environ. Mutagen.*, v. 312, n. 3, jun., p. 293-304, 2000.
- HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, v. 18, n. 2, maio, p. 187-190, 1973.
- HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPRAYS, P.; MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 18, n. 4, p. 277-291, 1991.
- KOEHLER, C.; GINZKEY, C.; FRIEHS, G.; HACKENBERG, S.; FROELICH, K.; SCHERZED, A.; BURGHARTZ, M.; KESSLER, M.; KLEINSASSER, N. Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 245, n. 2, p. 219-225, 2010.
- MELLO-DA-SILVA, C.A.; FRUCHTENGARTEN, L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. *J. Pediatr.* (Rio de Janeiro), v. 81, n. 5, p. 205-211, 2005.
- MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, v. 399, n. 2, p.135-147, 1998.

- OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microeletrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.
- PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 26, n. 4, p. 345-356, 1995.
- PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.*, v. 463, n. 3, p. 285-308, 2000.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. *Mutagênese ambiental*. Canoas: Editora da Universidade Luterana do Brasil, 2003. 356 p.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell eletrophoresis assay: methodology and aplications. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, v. 722, n. 1, p. 225-254, 1999.
- RYDBERG, B.; JOHANSON, K.B. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: HANAWALT, P.C.; FRIDBERG, E.C.; FOX, C.F. (Eds.) *DNA repair mechanisms*. New York: Academic Press, 1978, p. 465-468 apud OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microeletrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.
- SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutat. Res.-Environ. Mutagen.*, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.
- SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- STOCKS, S.J.; AGIUS, R.M.; COOLEY, N.; HARRISON, K.L.; BRISON, D.R.; HORNE, G.; GIBBS, A.; POVEY, A.C. Alkyltion of sperm DNA is associated with male factor infertility and a reduction in the proportion of oocytes fertilised during assisted reproduction. *Mutat. Res.-Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.*, v. 698, n. 1-2, abr., p. 18-23, 2010.
- STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 18, n. 2, p. 321-336, 1995.
- TAMBELLINI, A.T.; MIRANDA, A.C.; SANTOS, E.; CARNEIRO, F.; NETTO, G.F.; CASTRO, H.; CANCIO, J.; FINKELMAN, J.; ESCAMILLA, J.; AMORIM, L.C.; MORAES, L.R.S.; AUGUSTO, L.G.S.; GOUVEIA, N.; RIGOTTO, R.; LIEBER, R.R.;

- BLANK, V.; CÂMARA, V.; WAISSMAN W. Subsídios ao plano diretor de saúde e ambiente no âmbito do Sistema Único de Saúde. *Cad. Saúde Col.*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, jan./mar. p. 295-316, 2005.
- TARANTINI, A.; MAITRE, A.; LEFEBVRE, E.; MARQUES, M.; MARIE, C.; RAVANAT, J.L.; DOUKI, T. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, v. 671, n. 1, dez., p. 67-75, 2009.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo*. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety (IPCS). *Environmental health criteria 210: principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals*. Geneva: World Health Organization, 1999. [s.p.]
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety (IPCS). *Environmental health criteria 214: human exposure assessment*. Geneva: World Health Organization, 2000. [s.p.]
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme on Chemical Safety (IPCS). *Environmental health criteria 155: biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Geneva: World Health Organization, 1993. [s.p.]
- YENDLE, J.E.; TINWELL, H.; ELLIOT, B.M.; ASHBY, J. The genetic toxicity of time: importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* v. 375, n. 2, abr., p.125-136, 1997.