

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**NITROCOMPOSTOS E EXTRATOS ORGÂNICOS DE
PARTÍCULAS AÉREAS SÃO INDUTORES DE TOXICIDADE
GENÉTICA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE
*Drosophila melanogaster***

Rafael Rodrigues Dihl

**Tese submetida ao programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular
da UFRGS como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências**

Orientadora: Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

Porto Alegre

03/2008

**Dedico esta tese à Viviane,
pelo seu carinho, Amor e compreensão**

Natural Science

[Tide Pools]

“When the ebbing tide retreats

Along the rocky shoreline

It leaves a trail of tidal pools

In a short-lived galaxy

Each microcosmic planet

A complete society

A simple kind mirror

To reflect upon our own

All the busy little creatures

Chasing out their destinies

Living in their pools

They soon forget about the sea...

Wheels within wheels in a spiral array

A pattern so grand and complex

Time after time we lose sight of the way

Our causes can't see their effects...”

Rush (*Permanent Waves*)

“Ninguém pode ser perfeitamente livre
enquanto todos não forem livres;
ninguém pode ser perfeitamente moral
enquanto todos não forem morais;
ninguém pode ser perfeitamente feliz
enquanto todos não forem felizes”

H. Spencer

Agradecimentos

À HELÔ

Se hoje sou uma pessoa melhor, devo isto a ti, pelos ensinamentos, incentivo, dedicação, respeito, carinho e acima de tudo pela confiança que tu depositastes em mim ao longo destes 10 anos de convivência.

Além da admiração que tenho por todas as tuas conquistas profissionais também admiro a pessoa maravilhosa que és.

Se hoje tenho orgulho de ser pesquisador foi porque tive o privilégio e a honra de ter sido teu orientado.

Muito Obrigado!

À BIBA

Pela amizade, dedicação e pelo enorme carinho que fui tratado por ti ao longo destes anos de convivência.

Agradeço pelos conselhos e pelas palavras de incentivo durante esta jornada.

Nunca vou esquecer tudo o que me ensinaste!

Obrigado!

AOS MEUS PAIS

Jamais conseguirei transformar em palavras tudo o que vocês representam
para mim.

Obrigado por me darem uma estrutura sólida para que eu sempre pudesse ter
liberdade para escolher, mas acima de tudo obrigado por terem me ensinado
que com honestidade e respeito tudo fica mais fácil.

Agradeço por sempre estarem presentes quando precisei de vocês e por ter
orgulho deste filho que, às vezes imaturo, ama vocês de todo o coração.

À VIVIANE

A ti dedico este trabalho e o meu coração.

Obrigado pelos conselhos e incentivos ao longo desta caminhada e por
transmitir paz e conforto.

Quando estou contigo simplesmente me sinto a pessoa mais feliz, se é que
palavras podem descrever a sensação de estar ao teu lado.

Tudo o que construímos juntos foi fruto de confiança, respeito, carinho,
compreensão e sobretudo Amor

Temos muitos sonhos a realizar e tenho certeza de que vamos realizá-los, da
mesma forma que construímos a nossa Vida, juntos!

Te Amo!

Ao Mauricio, meu grande amigo, tu tens minha profunda admiração. Obrigado não apenas pela ajuda ao longo destes anos, mas também pelos ensinamentos, conselhos e o incentivo que vem desde a Iniciação Científica.

Foi um privilégio ter trabalhado contigo. Obrigado!

Às minhas colegas e sobretudo grandes amigas Megui e Vivi, vocês sabem que também são as minhas irmãs de coração. Agradeço pelas conversas descontraídas, pelos conselhos e pela amizade. Obrigado pela ajuda e pela companhia sempre constante. Tenham certeza de que podem contar sempre com este amigo! Tomara que um dia possamos trabalhar juntos novamente!

Aos meus avós Severino e Irmgard e a minha avó Nair, sempre preocupados com este neto, agradeço pelo carinho.

Ao meu irmão Gabriel, que apesar de não entender muito bem o que faço, jamais esqueço o quanto ele é importante.

Ao Fernando e a Ana Maria, sogro e sogra, e meu cunhado e amigo Fabio, agradeço pelo carinho com que sempre me trataram.

Ao Leandro, à Pollyana, à Mônica, à Paula e à Vivi pela ajuda na obtenção dos dados.

**“Como comportar-se com os amigos?
Como gostaríamos que se comportassem conosco”
Aristóteles**

Ao Ronaldo e à Fernanda, da ULBRA, pelas conversas descontraídas, pela amizade e pela ajuda.

À toda a equipe do Laboratório TOXIGEN da ULBRA: Alana, Amanda, Bruno, Stela, Guilherme, Judite, Juliana, Letícia, Mônica, Nádia, Paula, Ronaldo e Samanta, agradeço a amizade e a companhia.

À Carla, agradeço pela valiosa ajuda com a extração dos compostos orgânicos.

Ao Dr. Bernardo Liberman, agradeço por ter viabilizado as coletas e pela ajuda.

À Dra. Vera Lúcia Valente e a toda equipe do Laboratório de Drosophila da UFRGS, agradeço pelo carinho e pela amizade.

À Dra. Tânia Prochnow, agradeço pela ajuda e pelos ensinamentos sobre partículas aéreas.

À Dra. Virginia Schmitt, da PUC, agradeço pela confiança, ajuda e por ter disponibilizado o Laboratório para cultivo celular.

Ao Christian, pelos ensinamentos sobre cultivo celular, pela ajuda com a manutenção das células e também pela amizade.

“Não há dever que subestimemos mais do que o dever de ser feliz”

R.L. Stevenson

À Dra. Daisy Salvadori e todo o pessoal de Botucatu-SP, especialmente à Dani, pelo convívio e pelos ensinamentos com o teste de micronúcleo, no curto período que estive aí. Obrigado!

Ao Elmo, agradeço pela imensa ajuda ao longo deste tempo e pelo seu jeito sempre bem humorado de encarar as coisas e à Ellen, pela ajuda indispensável.

Aos colegas do Departamento de Genética da UFRGS pela amizade, e aos Professores do PPGBM que contribuíram para a minha formação.

Aos demais amigos, que são muitos, que por trás dos bastidores sempre dão apoio. Todos são e serão sempre muito especiais.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Mutagênese do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Laboratório da Toxicidade Genética (Toxigen) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Sumário

Resumo.....	13
Abstract.....	16
Capítulo I: Introdução Geral	19
1.1. Bioensaios Utilizados	27
1.1.1. Em Bactérias (<i>Salmonella typhimurium</i>).....	27
1.1.2. Em Plantas.....	31
1.1.3. Em Células de Roedores e de Humanos.....	34
1.1.4. Outros Testes Utilizados.....	37
1.2. O Teste SMART.....	39
1.3. Objetivos.....	42
Capítulo II: Mutagenic and recombinagenic activity of airborne particulates, PM10 and TSP, organic extracts in the <i>Drosophila</i> wing-spot test	44
Capítulo III: Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons are inducers of mitotic homologous recombination in the wing-spot test of <i>Drosophila melanogaster</i>	51
Capítulo IV: Discussão Geral.....	81
4.1. Diagnóstico da Toxicidade Genética.....	82
4.1.1. Extratos Orgânicos de MP10 e PTS.....	84
4.1.2. Nitrocompostos.....	86
4.1.3. Particulados Atmosféricos e NHAPs.....	90

4.2. Conclusões..... 93

Capítulo V: Bibliografia Geral..... 94

Resumo

Considerando os diversos efeitos adversos que a matéria particulada (MP) atmosférica e os contaminantes químicos ambientais causam aos ecossistemas e à saúde humana, o presente estudo procurou avaliar, o potencial mutagênico e recombinogênico de (i) extratos orgânicos de MP10, com diâmetro $<10\mu\text{m}$ e de particulados totais em suspensão (PTS), coletados na região metropolitana de Canoas nos meses de Novembro de 2003 (primavera) e Janeiro de 2004 (verão) — que sofre a influência de diversas indústrias e principalmente do intenso tráfego veicular da BR 116 e (ii) quatro nitro-derivados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (NHAPs), ambientalmente importantes — 1-Nitronaftaleno (1NN), 1,5-Dinitronaftaleno (1,5DNN), 9-Nitroantraceno (9NA) e 2-Nitrofluoreno (2NF). Para tanto foi empregado o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, que permite a detecção simultânea de mutação gênica e cromossômica, assim como de eventos relacionados com recombinação mitótica — possibilitando quantificar a contribuição deste último parâmetro genético para a genotoxicidade total dos contaminantes.

No que se refere à MP não foram observados resultados positivos na coleta de verão no cruzamento padrão, embora nas amostras da primavera tenham sido obtidos dois resultados positivos, referentes às amostras cruas (100%) de MP10 e de PTS. Entretanto, enquanto as genotoxinas presentes na MP10 induziram exclusivamente recombinação homóloga, as amostras de PTS apresentaram aproximadamente 62% de ação recombinacional e 38% de atividade mutacional, gênica e/ou cromossômica. Esta resposta genotóxica

diferencial pode ser relacionada a diferenças na composição dos contaminantes presentes nestas duas frações de partículas aéreas. Adicionalmente no cruzamento aprimorado as amostras coletadas na primavera — MP10 e PTS — induziram aumentos significativos na frequência de clones mutantes nas doses de 50 e 100% — que são induzidos exclusivamente por recombinação mitótica e estão relacionadas à presença de genotoxinas geradas no processo de metabolização via citocromo P450. Na coleta de verão foi diagnosticado um resultado positivo para o 100% de MP10, que não foi detectado no cruzamento padrão para esta mesma estação, indicando que os altos níveis de enzimas de metabolização, característicos deste cruzamento, funcionaram como mecanismo de ativação das genotoxinas presentes na fração orgânica das partículas inaláveis.

Os resultados obtidos para os nitrocompostos apontaram para efeitos positivos no genótipo trans-heterozigoto para os quatro NHAPs avaliados, produzindo aumentos estatisticamente significativos na frequência total de manchas, que representa a genotoxicidade total da amostra. Nos indivíduos heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3, apenas o 1,5DNN induziu aumentos significativos no total de manchas — indicando que além da ação recombinacional o 1,5DNN também induz mutação. Nos demais compostos — 1NN, 9NA e 2NF — a ausência de diferenças significantes em relação aos controles negativos no genótipo heterozigoto para o cromossomo TM3 é indicativo de que a ação tóxico-genética destes NHAPs deve-se basicamente à indução de recombinação mitótica entre cromossomos homólogos. O 1NN foi o composto com a maior potência genotóxica, induzindo cerca de 10 clones /10⁵ células/ mM — seguido pelo 9NA. Observa-se também que o 1NN é cerca de

333 vezes mais genotóxico que os compostos igualmente menos potentes — 1,5DNN e 2NF. Esta diferença em termos de potência genotóxica pode ser correlacionada à presença de um grupo nitro no 1NN e de dois grupos nitro no seu correspondente 1,5 DNN — sugerindo que o primeiro é provavelmente mais acessível à transformação metabólica do que o segundo.

Todas estas observações validam as investigações voltadas para a caracterização dos extratos orgânicos e dos contaminantes ambientais quanto a sua ação como indutores de recombinação homóloga (RH) *in vivo*. A RH é um evento associado a diferentes etapas do processo de tumorigênese, e a poluição aérea é responsável por ~10,7% dos casos de câncer de pulmão e ~1% de outros tipos de câncer — o que torna a avaliação da indução de RH fundamental para a obtenção de dados referentes ao risco genético imposto por contaminantes ambientais.

Abstract

Considering the several adverse effects of atmospheric particulate matter (PM) and of the environment chemical contaminants on the ecosystems and human health, the present study aimed to assess the mutagenic and recombinagenic potential of PM₁₀ organic extracts measuring less than 10 µm and of total suspended particulates (TSP) collected in the Greater Canoas region, in November 2003 (spring) and January 2004 (summer). The region is under the influence of diverse industrial activities and most specially of intense motor vehicle traffic from BR116. This study also investigated four nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) of environmental relevance: 1-Nitronaphthalene (1NN); 1,5-Dinitronaphthalene (1,5DNN); 9-Nitroanthracene (9NA); and 2-Nitrofluorene (2NF). The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* was used. The assay allows the simultaneous detection of gene and chromosome mutations, as well as of events related to mitotic recombination, which affords to quantify the contribution of this last genetic parameter to total genotoxicity of contaminants.

As regards PM, no positive results were observed in the standard cross for the summer collection, although the spring samples generated two positive results for the raw (100%) PM₁₀ and TSP samples. Nevertheless, while the genotoxins present in PM₁₀ induced only homologous recombination, the TSP samples presented roughly 62% of recombinational activity and 38% of gene and/or chromosome mutation activity. This distinct genotoxic response may be related to the different composition of contaminants present in these two

fractions of airborne particles. Additionally, the spring samples — PM10 and TSP, at the 50 and 100% doses — induced significant increases in mutant clone frequency in the high-bioactivation cross. These mutant clones are induced exclusively by mitotic recombination and are related to the presence of genotoxins produced in the cytochrome P450 metabolism process. For the summer samples, positive results were recorded for 100% of PM10, which was not detected in the standard cross for the same season, which suggests that the high levels of metabolism enzymes, typical of this cross, work as an activation mechanism for genotoxins present in the organic fraction of inhalable particles.

The results obtained for the nitrocompounds point to the positive effects on the trans-heterozygous for the four NPAHs assessed, which produced statistically significant increases in total spot frequencies, representing the total genotoxicity of the sample. Concerning the balancer chromosome TM3, only 1,5DNN induced significant increases in total spot frequencies in heterozygous individuals, which also indicated that apart from the recombinational action, 1,5DNN also induces mutation. For the other compounds, 1NN, 9NA, and 2NF, the absence of significant differences in comparison to the negative controls in the heterozygote genotype for chromosome TM3 indicates that the genotoxic action of these NPAHs is essentially due to the mitotic recombination between homologous chromosomes. 1NN was the compound with the highest genotoxic potential, inducing approximately 10 clones / 10^5 cells/ mM, followed by 9NA. It was also observed that 1NN is roughly 333 times more genotoxic than the equally less potent compounds — 1,5DNN and 2NF. This difference, in terms of genotoxic

potential, may be related to the presence of one nitro group in 1NN and to two nitro groups in its counterpart, 1,5DNN. This suggests that the former is probably more susceptible to metabolic transformation than the latter.

All these observations validate the investigations directed towards the characterization of organic extracts and of the environmental contaminants as regards their action as inducers of *in vivo* homologous recombination (HR). HR is an event associated to the different stages of tumorigenesis, and airborne pollution is accountable for ~10.7% of lung cancer cases and ~1% of other types of cancer — which makes the evaluation of HR essential to obtain data of the genetic risk posed by environmental contaminants.

Capítulo I

Introdução Geral



1. Introdução

O crescente registro da diminuição da camada de ozônio, as mudanças climáticas globais, assim como os acidentes industriais químicos e radioativos são questões preocupantes, que estimulam os debates sobre a necessidade de medidas imediatas e efetivas para a manutenção da qualidade ambiental. O crescimento populacional e o conseqüente aumento nas atividades agrícola e industrial, assim como a urbanização, são fatores de risco que podem levar tanto a diminuição da biodiversidade como da variabilidade genética de populações naturais — com aumento da vulnerabilidade ao estresse ambiental e subseqüente extinção das espécies. Ainda que a extinção e a evolução de novas espécies sejam parte da história da vida na Terra, a destruição acelerada de habitats naturais está diretamente relacionada ao declínio e ao desaparecimento de muitas populações (Bickham *et al.*, 2000).

Estima-se que os compostos genotóxicos constituem pelo menos 5% dos poluentes derivados da ação antrópica em qualquer ecossistema (Rajaguru *et al.*, 2001). Dependendo da concentração, as toxinas lançadas no ambiente podem causar danos diversos na biota a ela exposta. Embora na maioria das vezes não sejam capazes de provocar efeitos agudos e imediatos, podem, por outro lado, reduzir a sobrevivência destes organismos através de lesões crônicas que se manifestam, a médio e a longo prazo, como desordens fisiológicas em diferentes tecidos e órgãos ou como alterações genéticas (White e Rasmussen, 1998). Enquanto mudanças no conteúdo informacional de células somáticas podem ser associadas à indução de câncer e a diversas doenças degenerativas (Karsten e Krypsin-Sorensen, 1988; Kirkwood, 1989;

Bridges *et al.*, 1990; Fearon e Vogelstein, 1990), em células germinativas tais eventos podem levar a alterações que aumentam significativamente a carga genética das futuras gerações (Bickham *et al.*, 2000; De Wolf *et al.*, 2004).

Considerando que as populações estão expostas à contaminação ambiental, seja por via aérea, terrestre ou aquática, o monitoramento da poluição do ambiente tem um papel fundamental, não apenas para as populações humanas, mas também para os ecossistemas associados. Um ponto relevante relaciona-se ao fato de que as pessoas que habitam regiões contaminadas por poluentes aéreos sofrem exposição crônica, já que inalam cerca de 10.000 a 20.000 litros de ar/dia, o que significa que mesmo baixas concentrações de poluentes aéreos — especialmente compostos orgânicos associados a partículas aéreas — representam um risco genético (Scarpato *et al.*, 1993).

O termo matéria particulada (MP) refere-se tanto a partículas sólidas, quanto a gotas líquidas que se encontram em suspensão na atmosfera. Esta matéria não é um simples contaminante, mas acima de tudo uma mistura de muitas subclasses de poluentes, que contém diferentes espécies químicas (US Environmental Protection Agency, 1996). Ainda que a associação entre as concentrações das MPs e os seus efeitos sobre a saúde humana venha sendo objeto de inúmeros trabalhos experimentais, permanece em aberto a questão referente aos exatos mecanismos biológicos envolvidos na gênese de algumas doenças humanas relacionadas à poluição atmosférica. A estreita relação entre câncer de pulmão e agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos exógenos, associada ao fato de que a grande maioria destas genotoxinas é inalada através da MP — atingindo regiões específicas do trato respiratório, em função

dos seus diferentes diâmetros aerodinâmicos — justifica os inúmeros trabalhos envolvidos na caracterização dos efeitos genotóxicos dos poluentes presentes nas partículas aéreas (Buschini *et al.*, 2001). A MP atmosférica é constituída por diferentes frações (Figura 1) — definidas de forma geral como grossas, finas e ultrafinas — cuja origem está vinculada à fonte de poluição e como consequência aos mecanismos envolvidos na sua formação (Englert, 2004). Desta forma, a MP pode variar tanto na sua composição química (Fang *et al.*, 1999), quanto no seu efeito final sobre os seres humanos (Monn e Becker, 1997; Beeson *et al.*, 1998; Naeher *et al.*, 1999). A fração grossa, que inclui partículas maiores do que 2,5 micrômetros, origina-se primariamente de fontes naturais (poeira, pólen, bactérias, etc.) sendo gerada freqüentemente por forças mecânicas, enquanto as frações fina e ultrafina (partículas <2,5 e <0,1 micrômetros, respectivamente) são produzidas por emissões antropogênicas — principalmente mediadas pela intensidade do tráfego veicular. Sulfatos, ácidos fortes, amônia, nitratos, compostos orgânicos e elementos traço (incluindo metais), são formadores deste último tipo de MP. A grande maioria das fontes da MP fina está relacionada à combustão fóssil, à queima da vegetação e fusão mineral, e/ou a outros processos envolvendo combustão (Buschini *et al.*, 2001; De Kok *et al.*, 2006).

Partículas com um diâmetro superior a 10 μ m normalmente ficam depositadas nas cavidades oral e nasal, entretanto, partículas com diâmetro entre 2,5-10 μ m penetram regiões mais internas do trato respiratório. Particularmente, MP_{2,5} e partículas ultrafinas (<0,1 μ m), também chamadas de MP_{0,1}, podem causar mais efeitos adversos à saúde do que as partículas de maior tamanho, já que penetram profundamente nos alvéolos. De fato,

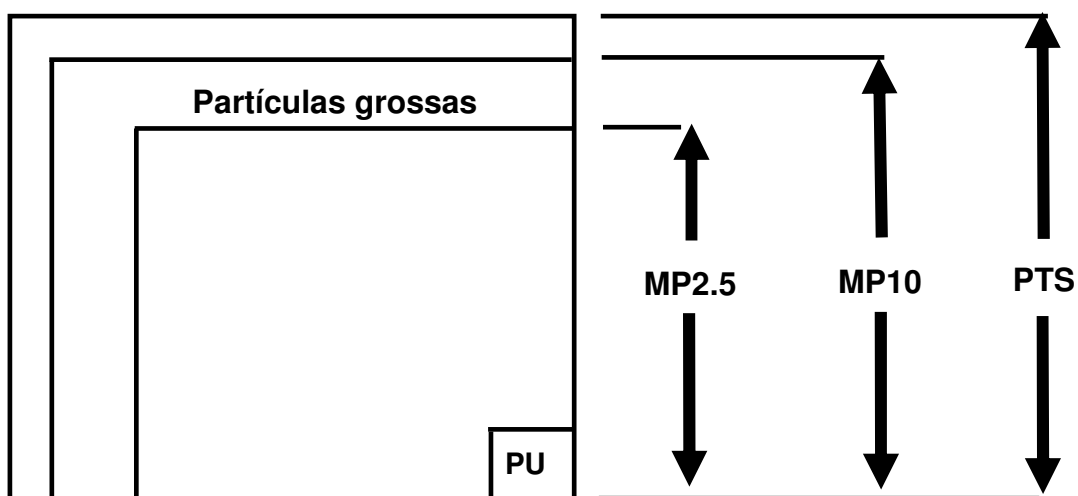


Figura 1: Frações da matéria particulada (MP). As partículas maiores abrangem as menores, ou seja, MP2,5 é parte de MP10, enquanto PU (partículas ultrafinas) é parte de MP2,5 e MP10. A área de cada quadrado representa a contribuição de cada fração para a MP em cidades Européias (Englert, 2004). PTS (particulados totais em suspensão).

uma série de estudos toxicológicos evidencia que as partículas com menor diâmetro causam mais inflamações nos pulmões do que as de maior diâmetro, mesmo quando constituídas por um mesmo material (Claxton *et al.*, 2004). O mecanismo que gera este efeito ainda não está bem compreendido, embora a indução de estresse oxidativo, pela formação de espécies reativas de oxigênio, pareça ser o mecanismo central, através do qual a MP gera o processo inflamatório, causando efeitos adversos a saúde (Donaldson *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2003). Somado a isto, estas espécies reativas também contribuem, através de uma via genotóxica, para as associações entre câncer de pulmão e exposição à MP, observado em diferentes estudos epidemiológicos (Beeson *et al.*, 1998; Pope *et al.*, 2002) (Figura 2).

Ainda que muitos compostos carcinogênicos e genotóxicos tenham sido isolados a partir das MPs — tanto na América do Norte, quanto na Ásia e Europa — na América Latina, onde as fontes de combustão são diferentes das destes hemisférios, poucas são as informações referentes a atividade genotóxica da matéria particulada (Kretzschmar, 1994, De Martinis *et al.*, 1999). Além disto, a potência tóxica da MP é determinada, em grande parte, pela sua composição química. De fato, compostos orgânicos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e seus nitro derivados (NHAPs) adsorvidos nos particulados, assim como metais presentes na fração inorgânica da MP, apresentam alto potencial mutagênico e citotóxico (De Kok *et al.*, 2006). Desta forma, a caracterização dos parâmetros físico-químicos das partículas atmosféricas é um dos primeiros passos envolvidos no monitoramento da qualidade do ar — já que estes valores podem ser extrapolados, quando da interpretação dos dados de genotoxicidade (Buschini

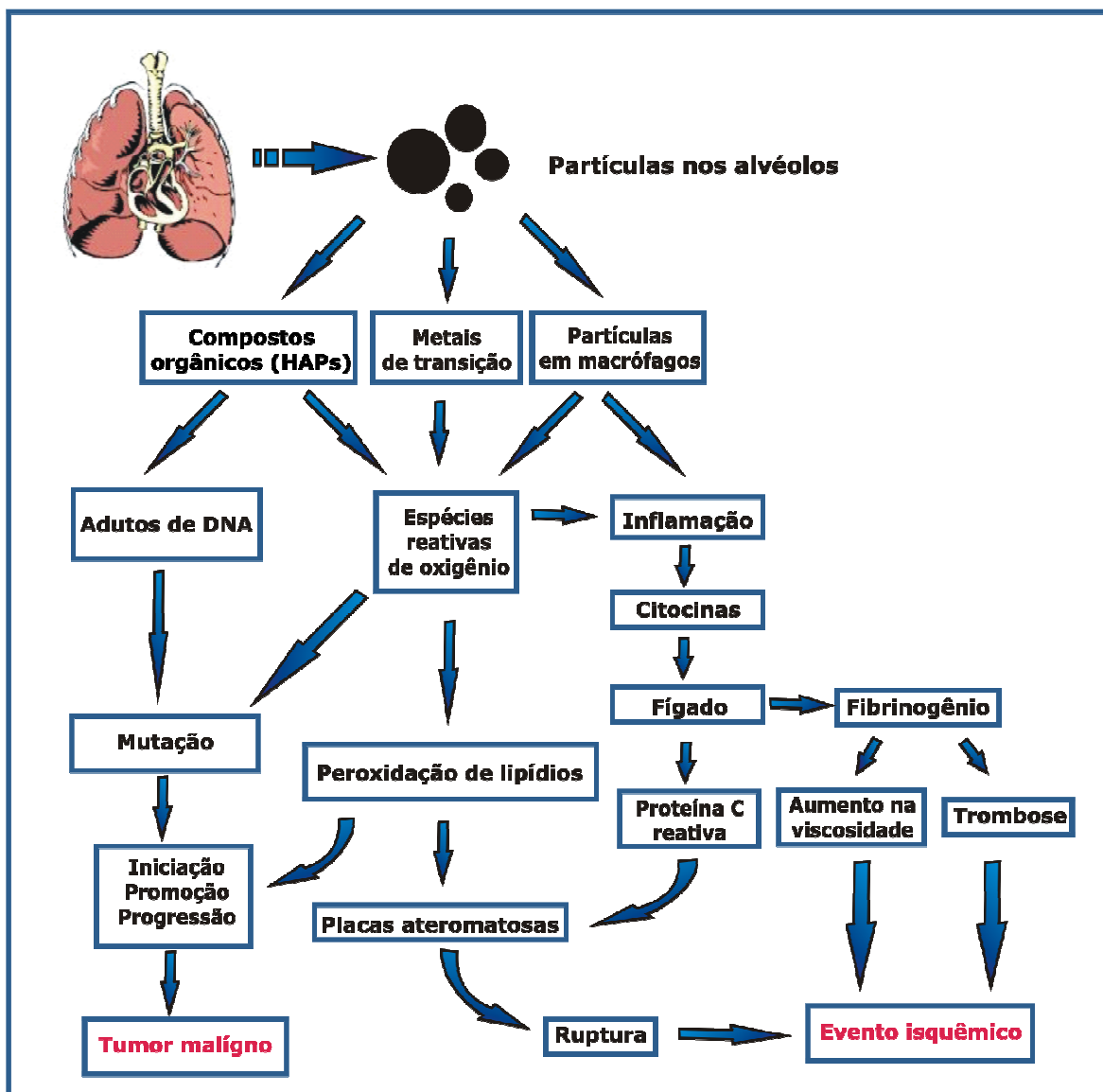


Figura 2: Diagrama hipotético que mostra como a exposição crônica às partículas aéreas pode levar ao câncer e a arteriosclerose (Sorensen *et al.*, 2003).

et al., 2001). Entretanto, a identificação de compostos mutagênicos específicos é limitada pela extrema complexidade da matéria orgânica extraída das partículas aéreas — o que leva à necessidade de fracionamento das amostras, ao isolamento e a posterior identificação dos compostos mutagênicos, visando à caracterização da resposta genotóxica (De Martinis *et al.*, 1999). Outro ponto relevante relaciona-se ao fato de que os resultados de genotoxicidade, obtidos para as diferentes frações destes extratos, nem sempre refletem o que verdadeiramente acontece na mistura complexa — onde as diferentes substâncias podem interagir de forma sinérgica, aditiva ou antagônica (Donnelly *et al.*, 1990). Os poluentes orgânicos adsorvidos estão geralmente presentes nas misturas complexas, de tal forma que o componente com potencial mutagênico pode ser o que possui a menor massa, o que dificulta a sua identificação — portanto, para que se possa identificar este componente, é preciso associar diferentes bioensaios genéticos que são aplicados para a análise da genotoxicidade da amostra bruta, assim como para as diferentes sub-frações obtidas durante o processo de fracionamento (Lewtas *et al.*, 1990).

Uma série de testes de curta duração pode ser empregada para a caracterização dos danos genéticos induzidos pela poluição aérea (Claxton e Woodall Jr., 2007) — permitindo definir o risco ambiental imposto tanto por misturas heterogêneas como por mutagênicos específicos — facilitando a aplicação de medidas de prevenção que visam à redução da carga genotóxica associada à poluição ambiental.

1.1. Bioensaios Utilizados

Diversos solventes e metodologias de extração são empregados para a análise da fração orgânica presente na MP atmosférica. Tais métodos têm influência direta sobre a resposta genotóxica observada em diferentes bioensaios, já que cada solvente apresenta uma maior ou menor afinidade por diferentes tipos de compostos orgânicos. Diclorometano (Černá *et al.*, 1999), metanol (Delgado-Rodríguez *et al.*, 1999), acetona (Kuo *et al.*, 1998) e ciclohexano (De Flora *et al.*, 1989) são os solventes extratores mais utilizados — assim como combinações com diferentes solventes (Vargas *et al.*, 1998; De Martinis *et al.*, 1999). Juntamente com o tipo de solvente utilizado, o método de extração também pode variar, indo desde o uso de sonicação (Sato *et al.*, 1995) e extração com Soxhlet (Delgado-Rodríguez *et al.*, 1999) até combinações destas duas metodologias (Barale *et al.*, 1989) — mais utilizados na extração das frações presentes na matriz.

1.1.1. Em Bactérias (*Salmonella typhimurium*)

Entre os diversos bioensaios de curta duração utilizados para avaliar os efeitos que misturas complexas podem causar no material genético destaca-se o teste de Ames (Ames *et al.*, 1975), que utiliza linhagens específicas de *Salmonella typhimurium* — fornecendo informações sobre alterações genéticas do tipo mutação gênica. De fato, este teste tem sido o mais empregado na detecção da atividade mutagênica associada à matéria particulada ambiental

— em torno de 50% dos trabalhos disponíveis na literatura (Claxton e Woodall Jr., 2007) — especialmente no que se refere aos extratos orgânicos, mostrando resultados significativos tanto em ausência como em presença de fração de metabolização (Claxton *et al.*, 2004).

Extratos orgânicos de partículas aéreas — coletadas na cidade de Xangai, na China — mostraram ação mutagênica direta e indireta quando avaliados na linhagem TA98, mas não na TA100. Tais achados sugerem que estas partículas sejam indutoras de mutações pontuais do tipo deslocamento do módulo de leitura, já que este é o tipo de alteração expresso na linhagem TA98. Também foi observado um acréscimo significativo no potencial mutagênico das sub-frações da matéria orgânica extraída (MOE) após ativação com a fração S9, caracterizando a ação pró-mutagênica destas sub-frações, ainda que tenha sido detectado um decréscimo da mutagenicidade do extrato orgânico total quando em presença da S9 (Zhao *et al.*, 2002).

Utilizando a linhagem TA100 de *S. typhimurium*, com e sem ativação metabólica, foi analisada a atividade mutagênica das MP2,5 e MP10 na cidade de Chiang Mai na Tailândia, durante o período de março de 1998 a outubro de 1999. Os dados obtidos mostraram que os dois extratos induziram mutações pontuais associadas aos seus metabólitos — e que esta resposta positiva está restrita aos meses de inverno, sugerindo que existe uma maior diluição dos poluentes nos meses de verão. Observou-se também que, nesta estação do ano, os níveis de MP2,5 e MP10 estavam acima dos permitidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) (Vinitketkumnuen *et al.*, 2002).

Quando as linhagens TA98 e YG1041 (níveis aumentados de nitroredução) foram utilizadas para analisar a mutagenicidade da MOE de particulados MP10, em uma região poluída da Boemia do Norte, verificou-se um aumento significativo na indução de mutantes, que foi maior nas amostras coletadas durante o inverno. De fato, a quantidade de MOE neste período foi 1,7 vezes mais alta do que a observada no verão, o que pode explicar a maior genotoxicidade das amostras coletadas na estação fria. Outro ponto relevante relaciona-se com a análise da potência mutagênica indireta de sub-frações aromáticas, contendo HAPs, que revelou baixos índices de mutagenicidade. No entanto, valores maiores foram observados em relação à ação direta das frações contendo NHAPs — confirmando que tais compostos foram os que mais contribuíram para a mutagênese das partículas aéreas (Černá *et al.*, 2000). Além disto, Pastorková *et al.* (2004) examinando extratos orgânicos de MP10 também obtiveram valores de mutagenicidade mais altos para a linhagem YG1041 do que para a TA98, sugerindo que as nitroarenas exerceram um papel fundamental na atividade mutagênica destas amostras, coletadas em quatro cidades na República Tcheca. Os autores observaram correlações entre o efeito mutagênico e as concentrações de HAPs, a exemplo do que foi posteriormente evidenciado por Du Four *et al.* (2004). De fato, estes últimos autores mostraram que tanto a atividade mutagênica (mediada pela TA98, com valores mais altos com o uso de S9), quanto as concentrações individuais dos 16 HAPs identificados foram maior no inverno do que no verão — em extratos de MP10 coletados em áreas industriais, rurais e urbanas em Flanders na Bélgica. Outro estudo conduzido na cidade de Maastricht, na Holanda, encontrou correlação entre a atividade mutagênica, utilizando TA98,

com e sem metabolização, e as concentrações de 16 HAPs (6 HAPs carcinogênicos) presentes em particulados totais em suspensão (PTS) — entretanto para MP_{2,5} esta correlação só ocorreu quando em presença da fração de metabolização S9 (De Kok *et al.*, 2005) .

Claxton *et al.* (2001) caracterizaram o potencial genotóxico da matéria particulada do ambiente aéreo — proveniente, primariamente, de emissões automotivas e de fumaça de queimadas — através do teste de Ames, por incorporação em placa e por suspensão. O teste em micro-suspensão é indicado para a análise de pequenas quantidades de amostra, tendo como vantagem adicional uma maior sensibilidade para amostras ambientais aéreas que contenham compostos nitroaromáticos, como previamente demonstrado por Kado *et al.* (1986). De fato, as MP_{2,5} coletadas no período de inverno apresentaram mutagenicidade em ambas as metodologias. Ainda que tenha sido observada uma maior variabilidade de respostas no método de micro-suspensão este foi uma ferramenta mais sensível do que a metodologia de incorporação em placa. Outro ponto relevante refere-se ao fato de que as respostas positivas no método de suspensão foram basicamente evidenciadas na linhagem TA98, estando relacionadas à ação de mutágenos diretos. Ao contrário, no teste de incorporação em placa, o uso de um sistema de metabolização exógeno aumentou a resposta mutagênica desta mesma cepa. O conjunto destes dados demonstra que alterações na metodologia de um mesmo bioensaio podem levar a respostas genotóxicas alternativas.

No Brasil, o teste de Ames também tem sido o mais utilizado para avaliar a toxicidade genética associada a MP atmosférica em áreas urbanas e industriais (Sato *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 1998; De Martinis *et al.*, 1999;

Ducatti *et al.*, 2001; Umbuzeiro *et al.*, 2008). Ducatti e Vargas (2003) avaliaram, através do teste de micro-suspensão, utilizando a linhagem TA98 e duas variantes — TA98NR e TA98/1,8DNP6 deficientes, respectivamente, nas funções de nitro-redução e de transacetilação — a atividade mutagênica dos PTS, em quatro pontos diferentes dentro da área urbana de Porto Alegre. O sítio com a maior influência do tráfego veicular foi também o que evidenciou a maior atividade mutagênica. Além disto, o decréscimo na atividade tóxico-genética observado nas linhagens TA98NR e TA98/1,8DNP6 indicou que os nitrocompostos contribuíram de forma significativa para a mutagenicidade da área urbana de Porto Alegre. Outro ponto relevante deste estudo está relacionado ao fato de que mesmo as amostras que com valores de PTS aceitáveis, pelos padrões estabelecidos por lei, mostraram atividade mutagênica.

1.1.2. Em Plantas

Embora o uso de plantas seja a princípio uma metodologia rápida e barata, ainda existem limitações, que restringem o uso deste sistema para a avaliação da toxicidade genética associada a amostras ambientais — já que nestes organismos processos fundamentais, como a metabolização de xenobióticos, ainda não estão bem compreendidos (Plewa *et al.*, 1983). Entretanto, estes organismos propiciam a obtenção de dados experimentais relacionados a danos cromossômicos mitóticos e meióticos e a mutações gênicas em *loci* múltiplos e específicos. Além disto, dos 84 compostos que

foram positivos em bioensaios centrados em plantas, 42 são poluentes aéreos ou pesticidas (Ma *et al.*, 2005).

Ainda que o teste de micronúcleos em animais seja direcionado para estudos, em laboratório, dos mecanismos patogênicos envolvidos com a perda de pedaços ou de cromossomos inteiros (Saldiva e Böhm, 1998), nenhum bioensaio animal, visando a detecção destas mutações cromossômicas, foi amplamente utilizado para monitoramento *in situ*. Entretanto, plantas multicelulares e eucarióticas, como a *Tradescantia*, têm sido efetivamente aplicadas para o monitoramento *in situ* da genotoxicidade de poluentes aéreos (Ma *et al.*, 1982; Arutyunyan *et al.*, 1999; Batalha *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003; Misik *et al.*, 2007).

Utilizando *Tradescantia pallida* — uma planta popular de jardim no Brasil — monitorou-se a genotoxicidade *in situ* de poluentes aéreos em dois pontos altamente poluídos da cidade de São Paulo (Cerqueira César e Congonhas) e dois pontos na área rural (Pirassununga e Caucaia do Alto). Através deste procedimento, foram observados acréscimos nas freqüências de micronúcleos em todos os pontos testados — sendo que os valores obtidos na área urbana foram significativamente superiores aos obtidos para a área rural (Guimarães *et al.*, 2000). Além disto, Carvalho-Oliveira *et al.* (2005) também demonstraram incremento nas freqüências de micronúcleos quando submeteram *Tradescantia pallida* a diferentes concentrações de extratos de MP2,5 coletados na área urbana de São Paulo.

Monarca *et al.* (1999) utilizaram este mesmo teste para avaliar a presença de compostos mutagênicos em particulados urbanos (MP10), bem como para monitorar, *in situ*, os poluentes gasosos presentes em duas cidades

da Itália, Brescia e Perugia. Particulados coletados em locais de tráfego intenso apresentaram resultados positivos, demonstrando um aumento significativo na frequência de micronúcleos. De fato, dados semelhantes foram também observados em um estudo *in situ* na área urbana de Caserta, ao sul da Itália (Isidori *et al.*, 2003).

Misik *et al.* (2006) monitoraram os efeitos genotóxicos de áreas poluídas em Bratislava na Eslováquia, utilizando o teste de micronúcleo em *Tradescantia paludosa*. Os níveis mais elevados de micronúcleos foram observados em área próxima a uma indústria agroquímica — com valores de 3,1 e 2,7 vezes superior aos controles negativos, respectivamente nos anos de 2003 e 2004. Efeitos mais brandos foram encontrados nas áreas de tráfego veicular e de indústrias de fabricação de vidros, embora o ponto situado próximo a uma indústria petroquímica não tenha apresentado efeitos significativos.

Utilizando *Allium cepa*, como organismo experimental, foram obtidos dados significativos quanto à indução de aberrações cromossômicas provocadas pela poluição atmosférica em uma região industrializada da Iugoslávia (Al Sabti, 1989), assim como atividade genotóxica — associada aos extratos da matéria particulada, em uma região de tráfego veicular na cidade de Parma na Itália (Poli *et al.*, 1999).

Através dos testes de micronúcleo e de troca entre cromátides irmãs em *Zea mays*, foi avaliada a genotoxicidade associada aos extratos de partículas grossas (10-2,5 μ m) e finas (2,5-0,4 μ m) em uma área urbana, com alta densidade de tráfego veicular, em L'Aquila na Itália. Tanto as partículas grossas quanto as finas induziram mutações cromossômicas, ainda que as

últimas tenham sido mais clastogênicas do que as primeiras. Neste mesmo estudo também foi demonstrado que os extratos de MP2,5 e MP10 induziram micronúcleos em *Daucus carotia* (Poma *et al.*, 2002).

1.1.3. Em Células de Roedores e de Humanos

O potencial genotóxico da MOE de partículas aéreas ambientais do tipo MP10 foi avaliado em cultura de células de mamíferos — cultura de hepatócitos provenientes de ratos machos e de células V79NH do pulmão de camundongos, expressando atividade de nitro-redutase, mas sem ação de citocromo P450. As amostras foram coletadas em duas regiões na República Checa — o distrito industrial de Téplice e o distrito rural de Prachatice — nos períodos de verão e inverno, que apresentam, respectivamente, níveis baixos e altos de poluição aérea. Como marcador da ação genotóxica das frações orgânicas, foram analisadas monoadições de DNA, através de marcação radioativa com ^{32}P . Através desta metodologia foi possível demonstrar que as frações aromáticas levemente polares — que contêm a maioria dos HAPs, bem como nitro derivados — induziram os maiores índices de monoadições, representados por 75 a 90% dos totais observados nas demais frações analisadas. Cabe ainda ressaltar, que os maiores valores foram detectados no período de inverno no distrito de Téplice (Topinka *et al.*, 2000).

A atividade citotóxica e genotóxica da MOE proveniente de MP2,5 e MP10 em uma área de baixo tráfego veicular na cidade de Hong Kong na China, foi avaliada através do teste colorimétrico de proliferação celular (MTT)

e do ensaio Cometa em cultura de fibroblastos de roedores. Os resultados evidenciaram que a atividade citotóxica foi mais elevada para MP_{2,5} no período de inverno, além disto, os dados referentes ao Cometa mostraram que os danos de DNA ocorreram em doses não citotóxicas. Este dado é um alerta para o fato de que a exposição crônica a doses não citotóxicas de poluentes aéreos pode levar ao acúmulo de lesões no DNA — o que poderia estar associado aos efeitos adversos da MP à saúde humana (Hsiao *et al.*, 2000).

Motta *et al.* (2004) utilizaram células epiteliais de fígado de hamster chinês (CHEL), que são metabolicamente competentes, para avaliar a frequência de aberrações cromossômicas induzidas por extratos orgânicos de PTS em dois pontos de alto tráfego veicular, localizados no centro da cidade de Catania na Itália. As amostras de ambos os pontos induziram efeitos clastogênicos na linhagem CHEL, mas não nas células de ovário de hamster chinês (CHO) — que não possuem metabolização — sugerindo que os compostos orgânicos presentes na MP destes pontos são pró-mutágenos e, portanto, precisam ser metabolicamente ativados antes de exercerem atividade genotóxica.

Outro estudo também utilizou células metabolicamente competentes (HEPG2), provenientes de carcinoma hepatocelular humano, para analisar extratos orgânicos de particulados MP₁₀ nas cidades européias de Praga (República Tcheca), Kosice (República da Eslováquia) e Sofia (Bulgária) através do ensaio Cometa. Os dados apontaram para aumentos significativos de danos no DNA em uma relação dose-dependente para as amostras oriundas destas três cidades. De fato, os aumentos nas quebras de fita de DNA induzidos pela MOE foram até quatro vezes superiores aos observados

para o controle negativo (Gábelová *et al.*, 2004). Já, Sevastyanova *et al.* (2007), utilizando extratos orgânicos de MP10 coletados nas mesmas cidades do estudo anterior, observaram que a linhagem HEPG2 foi a mais sensível, em comparação com células de fibroblasto de pulmão (HEL) e monócitos humanos (THP-1), na detecção da atividade genotóxica destas amostras, apresentando os níveis mais altos de monoadições de DNA — 15-190/10⁸ nucleotídeos contra, respectivamente, 2-15 e 1,5-3,7/10⁸ nucleotídeos em HEL e THP-1.

Um dos parâmetros avaliados por Calderón-Segura *et al.* (2004) — na Cidade do México em diferentes estações do ano, Abril (quente e seca), Agosto (quente e chuvosa) e Novembro (fria e seca) — foi a capacidade de extratos orgânicos de MP10 induzirem trocas entre cromátides irmãs em linfócitos humanos. As amostras obtidas nos três períodos de coleta apresentaram atividade genotóxica tanto na presença quanto na ausência de metabolização endógena, ainda que com valores de indução maiores quando a metabolização estava presente. Além disto, o período frio e seco, representado pelo mês de Novembro, foi o que mostrou as taxas mais altas de trocas entre cromátides irmãs. De fato, todos os 15 HAPs identificados neste estudo — através da cromatografia gasosa por espectrometria de massa — estavam presentes em níveis mais elevados em Novembro. Foi também observada uma maior quantidade de NHAPs tanto no mês de Novembro quanto no de Abril.

1.1.4. Outros Testes Utilizados

A determinação da ação tóxica da poluição aérea difusa foi analisada por técnicas *in vitro*, usando os Testes *umu* e o DR-CALUX. O primeiro baseia-se na introdução de um plasmídeo (pSK1002), contendo o gene *lac Z* fusionado ao gene SOS (*umu C*), que é transfectado para a cepa de *Salmonella typhimurium*. O segundo consiste de células de hepatoma, contendo um plasmídeo — que possui um gene para a luciferase, que está sob o controle transcricional de elementos de resposta à dioxina, ativando receptores aril-hidrocarbonetos. Ambos os testes mostraram respostas positivas no que se relaciona a quantificação da genotoxicidade associada à presença de HAPs, presentes nas partículas aéreas (Hamers *et al.*, 2000).

Utilizando o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART), Delgado-Rodríguez *et al.* (1999) analisaram misturas complexas presentes em particulados totais e MP10 — em duas localidades da Cidade do México, respectivamente Merced, no centro, e Pedregal de San Angel, no sudoeste. As amostras foram analisadas através de dois cruzamentos (padrão e aprimorado), sendo determinada, por cromatografia gasosa, a presença de HAPs nos extratos. Os resultados evidenciaram que os particulados MP10 apresentaram uma atividade genotóxica mais acentuada quando comparados com os particulados totais. De fato, a maior contribuição para a genotoxicidade total foi atribuída à presença de HAPs. Na região de Merced foram observados maiores concentrações de partículas atmosféricas e, conseqüentemente, maiores índices de genotoxicidade. Estes resultados demonstram a sensibilidade do

teste SMART — que é um teste de genotoxicidade eucariótico *in vivo* — como biomonitor da poluição ambiental, associada às partículas atmosféricas.

Soares *et al.* (2003) expuseram camundongos à atmosfera urbana de São Paulo durante um período de 120 dias, para posterior análise dos danos induzidos no DNA, expressos por aumentos nas freqüências de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico. Neste período também foram realizadas medições dos níveis de poluentes específicos presentes na MP — como MP10, CO, NO₂ e SO₂. Os autores encontraram fortes associações entre incrementos nas freqüências de micronúcleos e poluentes associados a emissões veiculares, confirmando que os níveis urbanos de poluentes aéreos podem causar mutações somáticas. Um trabalho semelhante — com o objetivo de avaliar quanto das mutações herdáveis em células germinativas relacionam-se com a exposição a partículas atmosféricas — expôs dois grupos de camundongos tanto a áreas urbanas como a áreas rurais. Para um grupo foi fornecido um filtro do tipo HEPA que elimina a exposição a particulados e compostos voláteis. Os camundongos que utilizaram o filtro HEPA apresentaram um nível muito reduzido de mutações em células germinativas comparado ao grupo exposto ao ar do ambiente, apoiando a hipótese de que a MP atmosférica é capaz de gerar mutações herdáveis (Somers *et al.*, 2004).

Finalmente, um número considerável de bioensaios de curta duração tem sido utilizado como ferramenta para avaliar o risco ambiental imposto pela poluição aérea. A maioria destes trabalhos está voltada para a avaliação da atividade genotóxica associada aos extratos orgânicos de particulados atmosféricos e para a identificação de contaminantes químicos presentes nestas amostras. Dentre estes contaminantes, os HAPs e seus derivados

NHAPs contribuem significativamente para a toxicidade genética observada na MP e, portanto, são freqüentemente alvo de avaliação. Concomitantemente, as respostas observadas nos diversos artigos científicos publicados reforçam a importância e a adequação do emprego de diferentes bioensaios para que se possa traçar um diagnóstico preciso da genotoxicidade associada aos poluentes aéreos.

1.2. O Teste SMART

Ainda que uma gama de bioensaios — utilizando diferentes organismos experimentais e detectando diversos tipos de lesão induzidas no DNA — venha sendo utilizada para avaliar o potencial genotóxico de misturas complexas associadas a poluição aérea, poucas são as informações relacionadas ao potencial recombinogênico deste tipo de amostra. Neste sentido, destaca-se o teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*, que permite a avaliação de danos que envolvem mutação gênica, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica, possibilitando a quantificação deste último evento para a genotoxicidade total dos compostos (Graf *et al.*, 1984). Este ensaio genético fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário, a amostra a ser analisada entra em contato com grupos de células (os discos imaginais), que proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas. A análise dos possíveis danos induzidos é feita pela observação de grupos de células (clones mutantes), na superfície das asas dos adultos, que

expressam fenotipicamente os genes marcadores *flr³* ou *mwh*, responsáveis por mudanças na forma dos pêlos ou tricomas. Estes fenótipos são o reflexo da indução de alterações genéticas que originam a perda de heterozigose nas células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos. Embora o número total de manchas forneça resultados quantitativos sobre a atividade genotóxica do composto, o tipo de mancha fornece informações sobre a natureza da lesão que originou os diferentes clones. Manchas mutantes simples (pequenas ou grandes) que expressam apenas um dos fenótipos mutantes, *flr³* ou *mwh*, indicam a ocorrência de mutações gênicas e/ou cromossômicas, assim como de eventos recombinogênicos. Por outro lado, manchas gêmeas — formadas por células adjacentes *flr³* e *mwh* — são originadas exclusivamente por recombinação somática (Graf *et al.*, 1984). O tamanho das manchas pode fornecer dados referentes ao tempo de atuação da genotoxina ao longo da embriogênese (Graf, 1995; Andrade *et al.*, 2004). O teste também permite a detecção de genotoxinas de ação direta — através do cruzamento padrão — e daquelas genotoxinas que precisam ser metabolizadas para exercer sua atividade — cruzamento aprimorado. Enquanto o primeiro cruzamento utiliza linhagens portadoras de níveis basais de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450, o segundo emprega linhagens com alta atividade destas enzimas, especialmente CYP6A2 (Frölich e Würigler, 1990a; Graf e Singer, 1992; Graf e van Schaik, 1992; Munerato *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2007).

A partir de cada cruzamento, obtêm-se dois genótipos distintos, designados como trans-heterozigotos para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³* (*mwh/flr³*) e heterozigotos para o cromossomo *TM3* (*mwh/TM3*). O

cromossomo *TM3* apresenta múltiplas inversões — que tornam inviáveis os produtos da recombinação — os indivíduos heterozigotos para o cromossomo *TM3* expressam somente mutações gênicas e/ou cromossômicas, o que permite quantificar a real contribuição da recombinação, quando estes resultados são comparados àqueles observados para os indivíduos trans-heterozigotos (Graf *et al.*, 1984; Cunha *et al.*, 2002; Lehmann *et al.*, 2003).

Ainda que o teste SMART tenha sido utilizado para a avaliação de uma gama de compostos — aproximadamente 400 — poucos trabalhos investigaram amostras ambientais (Amaral *et al.*, 2005, 2006; de Moraes Pantaleão *et al.*, 2007), sobretudo particulados atmosféricos (Graf e Singer 1989; Delgado-Rodríguez *et al.*, 1999). Neste sentido, a investigação do potencial genotóxico de partículas aéreas e de contaminantes ambientais específicos avaliados no SMART pode gerar informações passíveis de serem extrapoladas para a exposição humana a estes poluentes, já que a comparação do genoma humano com o de *Drosophila* aponta para a alta conservação evolutiva, não apenas em nível de seqüência de DNA, mas principalmente em relação às funções gênicas (Tickoo e Russel, 2002).

1.3. Objetivos

São notórias a necessidade e a urgência de se avaliar os riscos genéticos impostos pelos poluentes atmosféricos decorrentes da ação antrópica sobre os ecossistemas. Adicionalmente, a utilização de bioensaios mais informativos como hábeis ferramentas para avaliar a genotoxicidade deste tipo de amostra é outro aspecto de fundamental importância. A escassez de informações referentes à ação recombinogênica, assim como a ausência de investigações abrangendo, simultaneamente, mutações gênicas, cromossômicas e recombinação em um único bioensaio *in vivo*, utilizando um organismo eucarioto com alta similaridade genética e bioquímica com mamíferos, justificam o delineamento do presente trabalho — centrado na resposta de extratos orgânicos de partículas MP10 e PTS, bem como de nitrocompostos individuais, quando avaliados através do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Dentro deste contexto procurou-se atingir os seguintes objetivos:

- Caracterização da atividade tóxico-genética associada a extratos orgânicos de partículas MP10 e de PTS, a partir da análise qualitativa e quantitativa, envolvendo a detecção de mutação gênica e cromossômica, assim como de recombinação mitótica.
- Avaliação da atividade genotóxica associada a quatro NHAPs ambientalmente importantes, pela análise comparativa da potência genotóxica destes compostos por unidade de tratamento (mM), bem

como pela avaliação quantitativa da indução de recombinação mitótica em relação a mutações de origem gênica e/ou cromossômica.

Capítulo II

**Mutagenic and recombinagenic activity
of airborne particulates, PM10 and TSP,
organic extracts in the *Drosophila*
wing-spot test**



***Environmental Pollution* 151 (2008) 47-52**

**“A ciência é o grande antídoto ao veneno
do entusiasmo e da superstição”**

A. Smith

ARTIGO EM PDF

Environmental Pollution 151 (2008) 47-52

ARTIGO EM PDF

Environmental Pollution 151 (2008) 47-52

ARTIGO EM PDF

Environmental Pollution 151 (2008) 47-52

ARTIGO EM PDF

Environmental Pollution 151 (2008) 47-52

ARTIGO EM PDF

Environmental Pollution 151 (2008) 47-52

ARTIGO EM PDF

Environmental Pollution 151 (2008) 47-52

==== **Capítulo III** =====

**Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons are
inducers of mitotic homologous
recombination in the wing-spot test of
*Drosophila melanogaster***



***Food and Chemical Toxicology*, aceito para publicação**

“Qualquer pessoa que tenha experiência com o trabalho científico sabe que aqueles que se recusam a ir além dos fatos raramente chegam aos fatos em si”

Th. H. Huxley

NITROPOLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS ARE INDUCERS OF MITOTIC HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN THE WING-SPOT TEST OF *Drosophila melanogaster*.

R. R. Dihl¹, M. S. Bereta², V. S. do Amaral², M. Lehmann², M. L. Reguly² and H. H. R. de Andrade².

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Laboratório da Toxicidade Genética (TOXIGEN), Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada (PPGGTA), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

Keywords: **SMART, Genotoxicity, NPAHs, *Drosophila melanogaster*, Mitotic Recombination.**

Running title: NPAHs as inducers of mitotic recombination.

*Correspondence: Heloísa H. R. de Andrade, Laboratório da Toxicidade Genética – ULBRA, Prédio 22, 4º andar, Avenida Farroupilha, 8001, 92420-280, Canoas, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 34779214.

E-mail: heloisa@ulbra.br

Abbreviations: 1,5DNN, 1,5-dinitronaphthalene; HR, homologous recombination; LOH, loss of heterozygosity; 9NA, 9-nitroanthracene; 2NF, 2-nitrofluorene; 1NN, 1-nitronaphthalene; NPAHs, nitropolycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; SCEs, sister chromatid exchanges.

Abstract

In this study, the widespread environmental pollutants 1-Nitronaphthalene (1NN), 1,5-Dinitronaphthalene (1,5DNN), 2-Nitrofluorene (2NF) and 9-Nitroanthracene (9NA), were investigated for genotoxicity in the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) of *Drosophila* - using the high bioactivation (HB) cross. Our in vivo experiments demonstrated that all compounds assessed induced genetic toxicity, causing increased incidence of homologous somatic recombination. 2NF, 9NA and 1NN mutant clone induction is almost exclusively related to somatic recombination, although 1,5 DNN-clone induction depends on both mutagenic and recombinagenic events. 1NN has the highest recombinagenic activity (~100 %), followed by 2NF (~77%), 9NA (~75%) and 1,5DNN (33%). 1NN is the compound with the strongest genotoxicity, with 9NA being ~40 times less potent than the former and 2NF and 1,5DNN ~333 times less potent than 1NN. The evidence indicating that the major effect observed in this study is an increased frequency of mitotic recombination emphasizes another hazard that could be associated to NPAHs — the increment in Homologous Recombination (HR).

1. Introduction

Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) are widespread environmental pollutants present in both primary combustion emissions and air particulate matter. They can be formed in combustion processes, as well as in the reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with dinitrogen pentoxide, hydroxyl-, and nitrate- radicals, which are common in polluted atmospheres (Fan et al., 1996). Many of these compounds may represent a health hazard to humans, due to their widespread environmental presence and/or genotoxic activity (IARC, 1989). Numerous nitroarenes have been found to induce gene mutation and are associated with high incidence of tumors (Öztürk and Durusoy, 1999). In addition, the mutagenicity ascribed to nitroaromatic compounds seems to result from an electrophilic attack mainly at the C8-position of deoxyguanosine (Haack et al., 2001).

Much of the literature concerning air pollution comes from studies in North American and European cities (Villalobos-Pietrini et al., 2000). More recently, the effects of seasonal weather on genotoxicity, cytotoxicity, cytotoxicity and organochemical content of extracts from airborne particulates collected in Mexico City were described. Twelve of the most common NPAHs present in several polluted cities were analyzed, but only 8 were found in Mexico City. From these, 4 compounds were detected in large concentrations - 1-Nitronaphthalene (1NN); 1,5-Dinitronaphthalene (1,5DNN); 2-Nitrofluorene (2NF) and 9-Nitroanthracene (9NA) (Calderón-Segura et al., 2004). 2NF is a widely studied contaminant, being considered a model compound in studies of toxicant metabolism, carcinogenesis and mutagenesis (Heflich and Neft, 1994;

Hoffmann et al., 2001). 9NA was the contaminant responsible for all tumor induction events observed in a long-term study conducted by the National Toxicology Program (Butterworth et al., 2001). 1NN metabolites were associated with tumor induction in experimental animals (El-Bayoumy and Hecht, 1982). 1,5DNN, the nitro compound least investigated, has shown weak mutagenic response in the *Salmonella typhimurium* gene mutation assay (Tokiwa et al., 1985).

Although the mutagenic and carcinogenic properties related to some nitro compounds are well documented in the literature, little is known about the recombinational potency of NPAHs. Homologous recombination (HR) can be a major mechanism in the loss of heterozygosity (LOH) required for the second step in the two-step model or for a later event in a multi-step model of carcinogenesis. The elevated frequencies of HR and genome rearrangements observed in cells from human patients suffering from cancer-prone diseases and the report that HR can act as an alternative mechanism of telomere maintenance pointed out that homologous mitotic recombination is one of the most important processes required for carcinogenesis. (Bishop and Schiestl, 2001; 2003).

The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) is based on the loss of heterozygosity (LOH) induction, which may occur through various mechanisms, such as point mutation and certain types of chromosome mutations, as well as mitotic recombination. This versatile short-term *in vivo* assay simultaneously detects mutational and mitotic recombination events, and is able to quantify the recombinogenic activity of a compound in a genotoxicity screening. To obtain more detailed knowledge concerning the

genotoxic profile of four NPAHs — 1-Nitronaphthalene (1NN); 1,5-Dinitronaphthalene (1,5DNN); 2-Nitrofluorene (2NF) and 9-Nitroanthracene (9NA), we employed the high bioactivation (HB) version of the wing SMART test in *Drosophila melanogaster* (Andrade et al., 2004). The mutational and recombinational potential was quantified as well as the total genotoxicity as a function of exposure concentration was determined for all compounds — with special emphasis to their recombinagenic action in two intervals of the chromosome 3 of *D. melanogaster*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

In the present study, 1-Nitronaphthalene (CAS no. 86-57-7, Purity 99%); 1,5- Dinitronaphthalene (CAS no. 605-71-0, Purity 97%); 2-Nitrofluorene (CAS no. 607-57-8, Purity 98%); 9-Nitroanthracene (CAS no. 602-60-8, Purity 90%) were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Chemical structures of the compounds are presented in Figure 1. All tested compounds were dissolved in 5% ethanol and 5% Tween-80 before use.

2.2. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

2.2.1. Strains

a. *mwh*: The marker *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3), which is a completely recessive, homozygous viable mutation, is kept in a homozygous *mwh* strain.

b. High Bioactivation (HB) line: *ORR/ORR; flr³/ In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd⁶*. The *ORR* strain has chromosomes 1 and 2 from a DDT-resistant Oregon R(R) line, which are responsible for a high constitutive level of cytochrome P450. In particular, the CYP6A2 level is increased (Saner et al.,

1996), primarily as a result of mutation of the cytochrome P450 regulatory gene *Rst(2)DDT*. Information on these crosses is available in Graf and van Schaik, (1992). More details about the genetic markers are given in Lindsley and Zimm, (1992).

2.2.2. *Culturing and treatment of tester strains*

The genetic toxicity of the four compounds tested was assessed using the HB cross: *ORR/ORR; flr³/ TM3, Bd^S* females to *mwh/mwh* males. Flies were allowed to lay eggs for 8 h in culture vials, containing a solid agar base (3% w/v) completely covered with a layer of live fermenting baker's yeast supplemented with sucrose. Approximately 72 h after the end of the egg-laying stage, larvae were collected and distributed in plastic vials containing 1.5g of *Drosophila* Instant Medium (Carolina Biological Supply; Burlington, NC, USA) re-hydrated with 5 ml of the test solutions at different concentrations. Two experiments were performed with each compound and its concurrent negative controls. The larvae treated remained in the vials upon emergence of the surviving adult flies.

2.2.3. *Scoring of Wings*

The induction of LOH in the marker-heterozygous flies produces two mutant clones: (i) single spots, either *mwh* or *flr³*, resulting from point or

chromosome mutations as well as mitotic recombination, and (ii) twin spots, consisting of both *mwh* and *flr³* subclones, which are originated exclusively from mitotic recombination. In the balancer-heterozygous genotype, *mwh* spots reflect predominantly somatic point mutation and chromosome mutation, since mitotic recombination involving the balancer chromosome and its structurally normal homologue is a lethal event (Andrade et al., 2004).

2.2.4. Statistical analysis

To evaluate the statistical significance of the results obtained, we followed a multiple decision procedure of Frei and Würgler (1988), which makes four different diagnoses: positive, weakly positive, negative or inconclusive. The frequency of each type of mutant clone per fly of a treated series was compared pair-wise (i.e., negative control vs. tested compounds) using the conditional binomial test of Kastembaum and Bowman (1970). The recombinagenic action of the drugs was calculated comparing the standard frequency of clones/ 10^5 cells obtained from *mwh/flr³* and *mwh/TM3* genotypes (Frei and Würgler, 1996). For an unbiased comparison of this frequency just *mwh* clones in *mwh* single spots and in twin spots were used (Frei et al., 1992).

3. Results

The overall genetic toxicity results obtained by means of the analysis of both marker-trans-heterozygous (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) genotypes from the nitroaromatic compounds are presented in Table 1. For each concentration, the table shows the total number of flies analyzed, the frequency of the different mutant clones, as well as the total spots scored, which represent the final genotoxicity of the compound tested. In the case of positive statistical diagnosis, the (*mwh/TM3*) flies were also scored, which afforded to quantify the contribution of mutagenic and recombinagenic events to the final genotoxicity observed. The negative control frequencies of total spots per fly ranged from 0.97 to 1.00 for the *mwh/flr³* genotype and from 0.87 to 0.90 for the *mwh/TM3* genotype, being in accordance with the usual range previously reported in the literature (Würgler et al., 1985; Dihl et al., 2008). Prior to the genetic toxicity assessment, the organic compounds were submitted to a dose range test (data not shown), which demonstrated that 1NN presented the highest toxicity, followed by 9NA, 1,5DNN and 2NF, respectively in larvae fed for 48 h on each chemical. Non-toxic concentrations were used to perform the genotoxic evaluation of these drugs. It turned out that severity of toxic effect was similar for 1,5DNN and 2NF so that the four doses ranges presented in Table 1 for 9NA and 1NN do not overlap.

3.1. Genetic toxicity

As seen in Table 1, all four chemicals showed positive effect in the trans-heterozygous larvae, producing statistically significant increases in total spot frequencies, which means that they are clearly active in this test system. The data obtained also indicated that their genotoxic effects are related to increases in the small single spot frequencies in almost all concentrations assessed, although the large single and twin spots showed a statistically inconclusive or negative response. No dose-dependent increases were observed for the total spot frequencies across the exposure range for all compounds.

Considering the balancer-heterozygous genotype (*mwh/TM3*), 1,5 DNN was able to induce significant increases in the total spot frequencies, although at lower frequencies than in the marker-heterozygous ones. In fact, 1,5 DNN was the only compound that yielded positive results in this genotype, since 2NF, 9NA and 1NN data showed negative response.

3.2. Genetic toxicity as a function of exposure unit (mM)

In order to accomplish a quantitative comparison between the numbers of spots induced by the compounds, the data were unified to equimolar standardized values. The *mwh* clones figures observed in every exposure level (Table 1) were corrected by subtracting the number of spontaneous clones, in a manner that the corrected frequencies corresponded to an estimate of the mutant clones induced by the compounds. The respective control frequencies

and the number of flies analyzed in the different treatment series served as basis for this correction. An approximated range of spot induction frequency per exposure unit (mM) was estimated by combining data obtained from the different exposure levels, for each compound. The results obtained from this analysis are summarized in Table 2, such as standardized clone induction frequency, per (mM), per cell, and per cell division. 1NN is the compound with the highest genotoxicity, inducing ~ 10 mutant clones/ 10^5 cells /mM, followed by 9NA with ~ 0.25 mutant clones/ 10^5 cells/mM. In turn, 2NF and 1,5DNN showed a similar value, ~ 0.03 mutant clones/ 10^5 cells/mM. Thus, at least in this analysis, 1NN is the compound with the highest genotoxicity, with 9NA being ~ 40 times less potent than the former and 2NF and 1,5DNN ~ 333 times less genotoxic than 1NN.

The proportion of mitotic recombination versus somatic mutation was calculated based on the standardized frequencies [*mwh* clones per 10^5 cells per (mM)] obtained for the two genotypes, as shown in Table 2. The comparison between the two genotypes demonstrates that mitotic recombination is the prevalent mechanism by which 1NN ($\sim 100\%$), 2NF ($\sim 77\%$), 9NA ($\sim 75\%$) induce mutant wing spots. Conversely, mutagenic and recombinagenic events contribute for the observed increases in the frequency of mutant clones provoked by 1,5DNN — since about 33 and 67% of the spots are respectively of recombinational and mutational origin.

4. Discussion

The vast majority of nitro compounds present in environmental airborne particulate matter induces mutagenic events, and consequently the study of their genotoxicity as a whole is very relevant. The major objective of this study was to investigate the genotoxic potential of four nitro compounds linked to a parameter not yet estimated for these contaminants: the quantification of homologous recombination rearrangements in mitotic cells of an eukaryotic organism. The data obtained in our study showed that the four NPAHs assayed via the SMART are active in this test system, producing a statistically significant increase in the frequency of total spots in the HB cross trans-heterozygous flies (Table 1).

In previous studies using the SMART assay, it was observed that 2NF and 9NA were not genotoxic in the standard cross (ST) — with basal P450 constitutive level — although 1NN and 1,5DNN proved to be more genotoxic in the HB than in the ST cross (Graf et al., 1992; Delgado-Rodríguez et al., 1995). Altogether, this information associated and the data obtained in our study suggest that the genetic toxicity of the four compounds analyzed is mainly related to their metabolites produced via the P450 route. This interpretation is based on the difference between the two *Drosophila* crosses, since the high bioactivation ORR cross has a higher level of CYP6A2 than the ST cross (Saner et al., 1996). The CYP6A2 enzyme is similar to CYP3A of *Homo sapiens* (Aoyama et al., 1989) and to CYP3A16 of *Mus musculus* (Itoh et al., 1994). Since the total spot frequencies showed the same magnitude, regardless of the dose ranges employed, it is suggested that the P450CYP6A2

enzyme, present in a high constitutive level in the HB cross, has a limited ability to metabolize these compounds.

Although few studies have been conducted to detect the recombinational properties of NPAHs, these investigations pointed out that 1NN increased the frequencies of sister chromatid exchanges (SCEs) in cultured mammalian cells, and *N*-2-acetylaminofluorene — a 2NF- reactive metabolite — induces homologous recombination in *Escherichia coli*, in a dose-dependent manner (Boyes et al., 1991; Bichara et al., 2006). In the present study, we determined that homologous mitotic recombination accounts for ~100 , ~77, ~75 and ~33 % of the genotoxicity induced by 1NN, 2NF, 9NA and 1,5DNN, respectively. Specially concerning 1NN, 9NA and 2NF the genetic toxicity observed was associated with a high frequency of homologous mitotic recombination events, which means HR is the basic cause of the mutant clone inductions observed in the SMART assay. Homologous recombination (HR) in proliferating cells may play the special role of resolving stalled replication forks (Rothstein et al., 2000). Since covalent adducts are induced by nitro aromatic-intermediate reactive metabolites, one can conclude that a wide variety of nitro compounds that damage DNA and block the replication forks can also induce an increased HR frequency. This point is interesting because it raises the possibility that 1NN, 2NF and 9NA are able to favor the occurrence of rearrangements related to homologous recombination, a genetic phenomenon normally faced as an errant DNA repair mechanism that can result in loss of heterozygosity or genetic rearrangements — which are events involved in the genesis of innumerable genetic diseases, including cancer (Bishop and Schiestl, 2003).

Another finding observed in this study is the ability of 1,5DNN, 2NF and 9NA nitro compounds to induce also mutational events. The highest contribution of mutation to total genotoxicity was observed for 1,5DNN (67%), followed by 9NA (~25%) and 2NF (~23%). Accordingly, the genetic toxicity indicates that all compounds are inducers of point mutation in *Escherichia coli* reverse assay and *Salmonella typhimurium* Ames test (Tokiwa et al., 1985; Kappers et al., 2000; Hoffmann et al., 2001; Butterworth et al., 2001). Although 1NN was found to be negative for the induction of micronuclei in cultured mammalian cells (Sasaki et al., 1997), it is positive in *S. typhimurium* nitro reductase proficient strains (Ashby and Tennant, 1991).

1NN is the compound with a major genetic toxicity, followed by 9NA. The other two compounds, 2NF and 1,5DNN, have similar potencies, which are ~ 333 times less genotoxic than those observed for 1NN. 1,5DNN has been considered a weak mutagen in bacterial assays (Mc Coy et al., 1981), but in our experimental assay it induces mutant clones in a frequency similar to that observed for 2NF (Table 2), which is considered a model compound, being frequently used as positive control in mutagenesis studies. Previous data mentioning the mutagenic potency of 9NA and 2NF in the Ames test ascribed a similar activity for both compounds, expressed respectively for an induction of 173 revertants/ μg and 175 revertants/ μg (Butterworth et al., 2001). In our *in vivo* study, 9NA was ~8 times more potent than 2NF, which may be explained by the different parameters picked up by the two bioassays: gene mutation in Ames and preferentially mitotic recombination in SMART. 1NN genotoxicity was exclusively related to the induction of HR. However, the genetic toxicity associated to the corresponding di-substituted 1,5DNN was mainly related to

point and/or chromosomal mutation (67%) — only 33% of its genotoxic action was associated to mitotic recombination — moreover, 1,5DNN was ~333 times less potent than the corresponding compound carrying one nitro group. Thus, it seems that 1NN is probably more accessible to metabolic transformation than 1,5DNN, as previously demonstrated (Delgado-Rodríguez et al., 1995), and that 1NN and 1,5DNN intermediate reactive metabolites vary in terms of genotoxic mechanisms that lead to DNA induced-lesions.

More efforts should be made to identify nitro compounds adsorbed on airborne particles and to characterize recombinational properties related to these compounds and their activated nitrogen intermediates, thus affording a more complete scenario and a more effective risk assessment associated to the genotoxic profile of NPAHs.

5. Conclusions

In this context, progress in understanding the genotoxicity of NPAHs could be reached using the *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), since this assay — besides measuring mutational events like point and chromosomal mutations — is also able to distinguish homologous recombination (HR) in proliferative somatic cells, an event that may result in loss of heterozygosity. The high bioactivation strains are particularly useful for testing polycyclic aromatic hydrocarbons, as well as the related nitro derivatives and other aromatic chemicals (Frölich and Würigler, 1990; Delgado-Rodríguez et al., 1995). The evidence indicating that the major effect observed in this study is an increased frequency of mitotic recombination emphasizes another hazard that could be associated to NPAHs — the increase in HR.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. References

Andrade, H.H.R., Reguly, M.L., Lehmann, M., 2004. Wing somatic mutation and recombination test (SMART). In: Henderson D.S. (Ed), *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, pp. 389-412.

Aoyama, T., Yamano, S., Waxman, D.J., Lapenson, D.P., Meyer, V.A., Fisher, V., Tyndale, R.R., Inaba, T., Kalow, W., Gelbion, H.V., Gonzalez, F.J., 1989. Cytochrome P450 hPCN3, a novel cytochrome P450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. *J. Biol. Chem.* 264, 10388-10395.

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

Bichara, M., Pinet, I., Origas, M., Fuchs, R.P.P., 2006. Inactivation of *recG* stimulates the RecF pathway during lesion-induced recombination in *E.coli*. *DNA Repair* 5, 129-137.

Bishop, A.J. and Schiestl, R.H., 2001. Homologous Recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1471, M109-M121.

Bishop, A.J. and Schiestl, R.H., 2003. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Exp. Mol. Pathol.* 74, 94-105.

Boyes, B.G., Rogers, C.G., Stapley, R., 1991. Genotoxicity of 1-nitronaphthalene in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* 259, 111-121.

Butterworth, B.E., Mathre, O.B., Ballinger, K., 2001. The preparation of anthraquinone used in the National Toxicology Program cancer bioassay was contaminated with the mutagen 9-nitroanthracene. *Mutagenesis* 16, 169-177.

Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Butterworth, F., Amador-Muñoz, O., 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulares in Mexico City. *Mutat. Res.* 558, 7-17.

Delgado-Rodríguez, A., Ortíz-Marttelo, R., Graf, U., Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S., 1995. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 341, 235-247.

Dihl, R.R., Silva, C. G. A., Amaral, V.S., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2008. Mutagenic and recombinagenic activity of airborne particulates, PM10 and TSP, organic extracts in the *Drosophila* wing -spot test. *Environ. Pollut.* 151, 47-52.

El-Bayoumy, K. and Hecht, S.S., 1982. Comparative metabolism in vitro of 5-nitroacenaphthene and 1-nitronaphthalene. In: Cooke W.M., Dennis A.J., Fisher G.L. (Eds.), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*, 6th Int. Symp. Physical and Biological Chemistry, Battelle, Columbus OH, USA, pp. 263-273.

Fan, Z., Kamens, R.M., Hu, J., Zhang, J., McDow, S., 1996. Photostability of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons on combustion soot particles in sunlight. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1358-1364.

Frei, H., Clements, J., Hove, D., Würgler, F.E., 1992. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ-cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 279, 21-33.

Frei, H. and Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297-308.

Frei, H. and Würgler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11, 315-325.

Frölich, A. and Würgler, F.E., 1990. *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 234, 71-80.

Graf, U. and van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59-67.

Graf, U., Wild, D., Würzler, F.E., 1992. Genotoxicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and related compounds in *Drosophila*. *Mutagenesis*. 7, 145-149.

Haack, T., Erdinger, L., Boche, G., 2001. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. of nitroso and respective hydroxylamine compounds. *Mutat. Res.* 491, 183-193.

Heflich, R.H. and Neft, R.E., 1994. Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene, and some of their metabolites and model metabolites. *Mutat. Res.* 318, 73-174.

Hoffmann, G.R., Janel-Bintz, R., Fuchs, R.P.P., 2001. Induction of 2 frameshift mutations by 2-nitrofluorene, *N*-hydroxyacetylaminofluorene, and *N*-2-acetylaminofluorene in reversion assays in *Escherichia coli* strains differing in permeability and acetyltransferase activity. *Mutat. Res.* 493, 127-137.

International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, 1989. Diesel and Gasoline Engine Exhausts and some Nitroarenes. IARC, Lyon, Publication n°46, p. 359.

Itoh, S., Satoh, M., Abe, Y., Hashimoto, H., Yanagimoto, T., Kamataki, T., 1994. A novel form of mouse cytochrome-P4503A (*cyp3A-16*). Its cDNA cloning and expression in fetal liver. *Eur. J. Biochem.* 226, 877-882.

Kappers, W.A., van Och, F.M.M., de Groene, E.M., Horbach, G.J., 2000. Comparison of three different in vitro mutation assays used for the investigation of cytochrome P450-mediated mutagenicity of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 466, 143-159.

Kastembaum, M.A. and Bowman, K.O., 1970. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527-549.

Lindsley, D.L and Zimm, G.G., 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York, 1133 p.

McCoy, E.C., Rosenkranz, E.J., Petrullo, L.A., Rosenkranz, H.S., Mermelstein, S., 1981. Structural basis of the mutagenicity in bacteria of nitrated naphthalene and derivatives. *Environ. Mol. Mutagen.* 3, 499-511.

Öztürk K and Durusoy, M., 1999. The detection and comparison of the genotoxic effects of some nitro aromatic compounds by the *umu* and SOS chromotest systems. *Toxicol. Lett.* 108, 63-68.

Rothstein, R., Michel, B., Gangloff, S., 2000. Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes. Dev.* 14, 1-10.

Saner, A., Weibel, B., Würgler, F.E, Sengstag, C., 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* 27, 46-58.

Sasaki, J.C., Arey, J., Eastmond, D.A., Parks, K.K., Grosovsky, A.J., 1997. Genotoxicity induced in human lymphoblasts by atmospheric reaction products of naphthalene and phenanthrene. *Mutat. Res.* 393, 23-35.

Tokiwa, H., Nakagawa, R., Horikawa, K., 1985. Mutagenic/carcinogenic agents in indoor pollutants; the dinitropyrenes generated by kerosene heaters and fuel gas and liquefied petroleum gas burners. *Mutat. Res.* 157, 39-47.

Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S., Amador-Muñoz, O., 2000. Genetic monitoring of airborne particles. In: Butterworth F., Gunatilaka A., Gonsebatt M. (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Kluwer Academic/Plenum Publishing Corp., New York, pp. 457-486.

Würgler, F. E., Graf, U., Frei, H., 1985. Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. *Prog. Mutat. Res.* 5, 325-40.

Legend to figure

Figure 1. Chemical structures of 2-Nitrofluorene (2NF), 1,5-Dinitronaphthalene (1,5DNN), 1-Nitronaphthalene (1NN) and 9-Nitroanthracene(9NA).

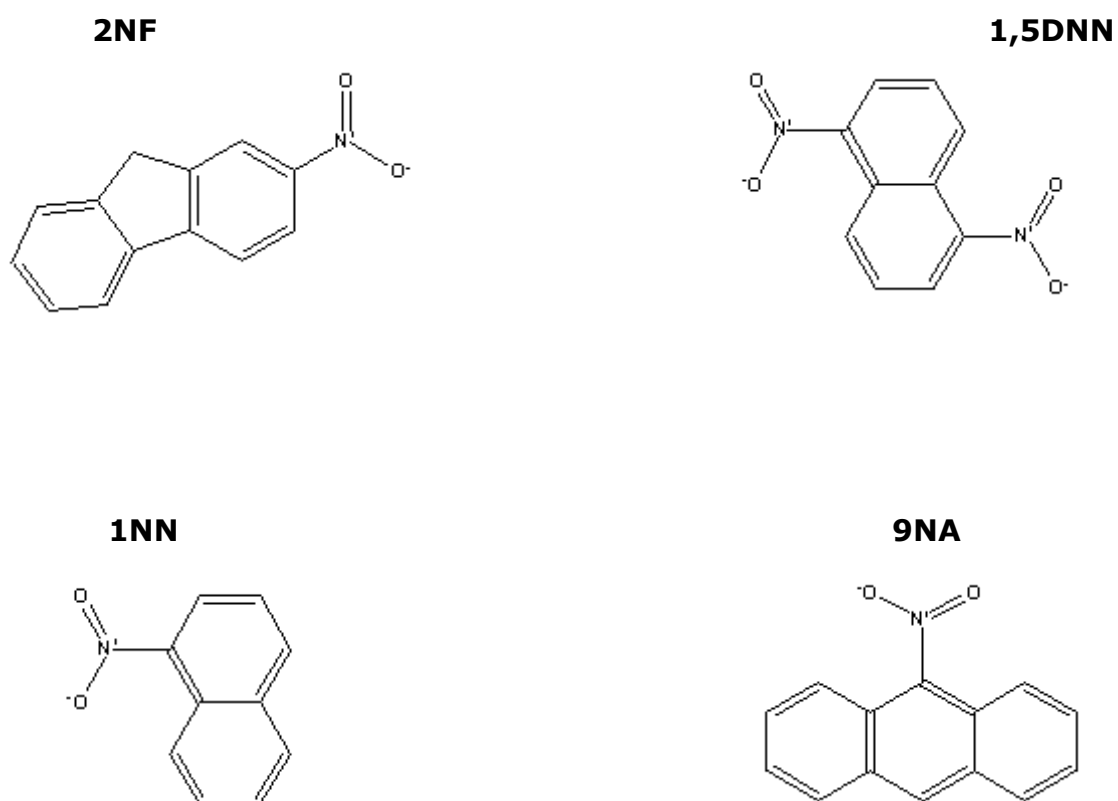
**Figure1**

Table 1. Fly spot data obtained after exposure of marker (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (*mwh/TM3*) larvae of *D. melanogaster* to 2NF, 9NA, 1,5DNN and 1NN.

Genotypes	Concentration (mM)	No. of flies (N)	Spots per fly (no. of spots)/statistical diagnosis ^a				Total <i>mwh</i> clones ^c (n)
			Small single spots ^b (1-2 cells) (<i>m</i> = 2)	Large single spots ^b (>2 cells) (<i>m</i> = 5)	Twin spots (<i>m</i> = 5)	Total spots (<i>m</i> = 2)	
2NF							
<i>mwh / flr³</i>	NC	40	0.63 (25)	0.20 (8)	0.15 (6)	0.98 (39)	37
	12.5	30	1.27 (38) +	0.43 (13) i	0.30 (9) i	2.00 (60) +	59
	25	40	1.10 (44) +	0.28 (11) i	0.15 (6) i	1.53 (61) +	61
	50	30	1.27 (38) +	0.20 (6) i	0.27 (8) i	1.73 (52) +	52
	100	30	1.23 (37) +	0.37 (11) i	0.07 (2) -	1.67 (50) +	49
<i>mwh / TM3</i>	NC	30	0.83 (25)	0.03 (1)	^d	0.87 (26)	26
	12.5	30	1.17 (35) i	0.07 (2) i		1.23 (37) i	37
	25	30	0.90 (27) -	0.03 (1) i		0.93 (28) -	28
	50	30	0.77 (23) -	0.07 (2) i		0.83 (25) -	25
	100	30	1.03 (31) i	0.17 (5) i		1.20 (36) i	36
9NA							
<i>mwh / flr³</i>	NC	20	0.75 (15)	0.05 (1)	0.20 (4)	1.00 (20)	20
	2.5	20	1.55 (31) +	0.20 (4) i	0.10 (2) i	1.85 (37) +	37
	5.0	20	1.65 (33) +	0.15 (3) i	0.00 (0) -	1.80 (36) +	36
	7.5	20	1.40 (28) +	0.20 (4) i	0.05 (1) -	1.65 (33) +	32
	10	20	1.55 (31) +	0.25 (5) i	0.05 (1) -	1.85 (37) +	37
<i>mwh / TM3</i>	NC	20	0.90 (18)	0.00 (0)	^d	0.90 (18)	18
	2.5	20	1.00 (20) i	0.10 (2) i		1.10 (22) i	22
	5.0	20	0.90 (18) -	0.10 (2) i		1.00 (20) i	20
	7.5	20	1.10 (22) i	0.05 (1) i		1.15 (23) i	23
	10	20	1.15 (23) i	0.00 (0) i		1.15 (23) i	23

1,5DNN

<i>mwh / flr³</i>	NC	40	0.63 (25)	0.20 (8)	0.15 (6)	0.98 (39)	37
	12.5	40	1.60 (64) +	0.23 (9) i	0.00 (0) -	1.83 (73) +	71
	25	40	1.28 (51) +	0.20 (8) i	0.15 (6) i	1.63 (65) +	65
	50	40	1.48 (59) +	0.15 (6) i	0.10 (4) i	1.73 (69) +	68
	100	40	1.43 (57) +	0.23 (9) i	0.03 (1) -	1.68 (67) +	67
<i>mwh / TM3</i>	NC	30	0.83 (25)	0.03 (1)	^d	0.87 (26)	26
	12.5	20	0.90 (18) -	0.05 (1) i		0.95 (19) -	19
	25	30	1.40 (42) +	0.03 (1) i		1.43 (43) +	43
	50	30	1.43 (43) +	0.10 (3) i		1.53 (46) +	46
	100	30	1.23 (37) i	0.40 (12) +		1.63 (49) +	47

1NN

<i>mwh / flr³</i>	NC	30	0.80 (24)	0.10 (3)	0.07 (2)	0.97 (29)	29
	0.90	30	1.00 (30) i	0.10 (3) i	0.07 (2) i	1.17 (35) -	35
	1.20	30	1.23 (37) i	0.27 (8) i	0.17 (5) i	1.67 (50) +	49
	1.50	30	1.17 (35) i	0.27 (8) i	0.13 (4) i	1.57 (47) +	47
	1.80	30	1.50 (45) +	0.30 (9) i	0.03 (1) i	1.83 (55) +	55
<i>mwh / TM3</i>	NC	20	0.85 (17)	0.05 (1)	^d	0.90 (18)	18
	1.20	20	0.80 (16) -	0.00 (0) i		0.80 (16) -	16
	1.50	20	0.60 (12) -	0.05 (1) i		0.65 (13) -	13
	1.80	20	0.90 (18) -	0.00 (0) i		0.90 (18) -	18

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würigler (1988): +, positive; -, negative; i, inconclusive; *m*, multiplication factor for the assessment of significantly negative results. Significance levels $\alpha=\beta=0.05$. ^bIncluding rare *flr³* spots. ^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single spots and from twin spots. ^dOnly *mwh* single spots can be observed in *mwh/TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation. NC = Negative Control.

Table 2. Standardized *mwh* clone induction frequencies per millimolar unit of exposure concentration and the prevalence of recombinational events^a

Compounds	<i>mwh/flr³</i> marker trans-heterozygotes				<i>mwh/TM3</i> -inversion heterozygotes				Recombination (%)
	Standardized frequency ^b (<i>mwh</i> clones per 10 ⁵ cells per mM) (<i>f_t</i>)	Mean clone size (<i>i_t</i>)	Geometric mean of clone size ^c (2^{i_t-1})	Standardized frequency per 10 ⁵ cells, corrected for clone size ^d ($f'_{t=2^{i_t-2}} \times f_t$)	Standardized frequency ^b (<i>mwh</i> clones per 10 ⁵ cells per mM) (<i>f_h</i>)	Mean clone size (<i>i_h</i>)	Geometric mean of clone size ^c (2^{i_h-1})	Standardized frequency per 10 ⁵ cells, corrected for clone size ^d ($f'_{h=2^{i_h-2}} \times f_h$)	
2NF	0.035	1.98	1.97	0.034	0.008	1.55	1.46	0.006	77.1
1,5DNN	0.033	1.15	1.11	0.018	0.022	1.68	1.60	0.017	33.3
9NA	0.254	1.38	1.30	0.166	0.065	2.81	3.51	0.115	74.4
1NN	9.7	2.02	2.03	9.8	-1.6	3.3	4.92	-3.90	116.5

^aAll values are control-corrected. Frequencies in *mwh/flr³* marker-heterozygotes are calculated with and without clone size correction; accordingly, somewhat different estimates are obtained for the relative contributions of recombination to the totals of clone induction; ^bClone frequencies per fly divided by the number of cells examined per fly (48 800) estimate frequencies per cell and per cell division in chronic exposure experiments (Frei and Würzler, 1988); ^cGeometric mean and ^dCorrections calculated according to Frei et al., (1992).

Capítulo IV

Discussão Geral



4. Discussão Geral

Diversos estudos epidemiológicos correlacionaram a exposição à matéria particulada atmosférica a uma série de efeitos adversos a saúde humana. A exposição em longo prazo, a altas concentrações de MP, aumenta o risco de câncer de pulmão, doenças respiratórias e arteriosclerose. Enquanto que a exposição aguda, agrava doenças respiratórias, como asma e bronquite, assim como favorece o aparecimento de problemas cardiovasculares (Sorensen *et al.*, 2003).

Há aproximadamente quatro décadas as investigações direcionadas para a análise da poluição aérea estavam baseadas apenas na identificação de componentes tóxicos presentes no ar, assim como no risco total imposto por tais toxinas aos organismos expostos. Relacionar a exposição humana a múltiplos compostos e misturas complexas dinâmicas foi e continua sendo um grande desafio — ainda hoje algumas toxinas permanecem desconhecidas e os contaminantes já identificados não foram integralmente investigados (Claxton *et al.*, 2004).

4.1. Diagnóstico da Toxicidade Genética

A maioria dos estudos disponíveis na literatura, evidencia a ação tóxico-genética associada à poluição aérea — principalmente a poluição urbana contém muitas classes de compostos orgânicos voláteis ou aderidos a partículas que são comprovadamente mutagênicos. Tais agentes com

propriedades tóxico-genéticas são oriundos, sobretudo de fontes antropogênicas — produzidos pela combustão, ou provenientes de reações químicas atmosféricas (produtos secundários). Ainda que já tenham sido identificados centenas de compostos genotóxicos presentes no ambiente aéreo, somente alguns poucos (menos de 25 HAPs e compostos nitroaromáticos) são regularmente monitorados (Claxton e Woodall Jr., 2007).

Dentre os diferentes tipos de danos genotóxicos induzidos por extratos orgânicos, as mutações gênicas, assim como as aberrações cromossômicas são as lesões mais freqüentemente investigadas — em diversos organismos testes e em uma multiplicidade de bioensaios. Inequivocamente, a poluição presente no ambiente aéreo impõe uma série de riscos genéticos aos organismos. Neste sentido, a investigação de novos parâmetros genéticos — como a recombinação mitótica — envolvida em rearranjos cromossômicos, assim como na perda da heterozigose — são necessários para que se obtenha um melhor diagnóstico dos tipos de danos induzidos pelos contaminantes aéreos. O presente trabalho utilizou como bioensaio o SMART, que detecta simultaneamente vários parâmetros genéticos, mutação gênica e aberrações cromossômicas — aneugênese e clastogênese — assim como a recombinação mitótica (Andrade *et al.*, 2004). Os dados obtidos evidenciam que o SMART é uma ferramenta precisa para traçar o perfil genotóxico de extratos orgânicos adsorvidos em partículas aéreas e de contaminantes orgânicos ambientalmente importantes - como os nitro compostos presentes na atmosfera. Somado a isto a *Drosophila melanogaster* é um excelente modelo para estudar a genotoxicidade e seus mecanismos moleculares, fornecendo

respostas relevantes que podem ser extrapoladas para humanos (St. John e Xu, 1997).

4.1.1. Extratos Orgânicos de MP10 e PTS

Neste trabalho foi avaliado, através do SMART, o potencial mutagênico e recombinogênico de extratos orgânicos de MP10 e de PTS, na região metropolitana de Canoas, que está sob influência de diversas indústrias e, principalmente do intenso tráfego veicular da BR 116. As coletas foram realizadas nos meses de Novembro de 2003 e Janeiro de 2004, correspondendo a, respectivamente, primavera e verão. Para a extração da fração orgânica, foi utilizado o sistema baseado em um único solvente — metanol, que tem uma maior afinidade para extrair compostos mais polares presentes na matriz.

Ainda que não tenham sido observados resultados positivos na coleta de verão no cruzamento padrão, nas amostras da primavera foram diagnosticados dois resultados positivos, referentes às amostras cruas (100%) de MP10 e de PTS. Entretanto, enquanto as genotoxinas presentes na MP10 induziram exclusivamente recombinação homóloga, as amostras de PTS apresentaram aproximadamente 62% de ação recombinacional e 38% de atividade mutacional, gênica e/ou cromossômica. Desta forma, observa-se uma resposta genotóxica diferencial dos PTS e da MP10, que pode ser relacionada a composição de contaminantes presentes nas duas frações de partículas aéreas. Outro ponto a ser analisado é o fato das amostras de verão

não terem induzido atividade tóxico-genética. A dispersão dos poluentes é um fator fundamental que deve ser considerado ao se trabalhar com poluição atmosférica, já que a ação dos ventos influencia diretamente a dispersão das genotoxinas a partir das fontes de emissão (Vinitketkumnuem *et al.*, 2002). Neste sentido, o vento oeste que soprava nos dias de coleta da primavera poderia ser o responsável pela dispersão dos poluentes provenientes tanto da BR116 como das indústrias, até os filtros de amostragem. Já no verão o vento sudeste dispersou a maioria dos poluentes em outra direção.

Considerando a coleta da primavera, no cruzamento aprimorado, tanto MP10 quanto PTS induziram aumentos significativos na frequência de clones mutantes em comparação ao controle negativo, nas doses de 50 e 100%. Além disto, a exclusiva indução de recombinação mitótica no cruzamento aprimorado está relacionada com a presença de genotoxinas geradas no processo de metabolização via citocromo P450. Na coleta do verão foi diagnosticado um resultado positivo para o 100% da MP10, que não foi detectado no cruzamento padrão para esta mesma estação, indicando que os altos níveis de enzimas de metabolização, característicos deste cruzamento, funcionaram como mecanismo de ativação das genotoxinas presentes na fração orgânica das partículas inaláveis.

Considerando os dados obtidos para os extratos metanólicos provenientes da matéria particulada da região metropolitana de Canoas, é evidente que as amostras testadas são preferencialmente indutoras de recombinação homóloga — com maior frequência no cruzamento aprimorado, que se caracteriza por níveis elevados de enzimas do tipo CYP450. Por outro lado, no cruzamento padrão — que detecta preferencialmente genotoxinas de

ação direta — se observa um padrão de resposta genotóxica distinto, já que há a contribuição adicional, de aproximadamente 38%, de eventos relacionados à mutação gênica e/ou cromossômica. É ainda importante salientar que o cruzamento aprimorado é fundamental para a avaliação de compostos orgânicos, como HAPs, NHAPs e outros produtos químicos aromáticos, aderidos aos particulados (Frölich e Würigler, 1990b; Delgado-Rodríguez *et al.*, 1995). Além disto, somado a outros parâmetros genéticos já relacionados a partículas aéreas — mutação gênica (De Kok *et al.*, 2005); trocas entre cromátides irmãs (Calderón-Segura *et al.*, 2004); quebras de fitas de DNA (Buschini *et al.*, 2001) e monoadições de DNA (Topinka *et al.*, 2000) — a recombinação homóloga (RH) aparece como mais um mecanismo através do qual a MP pode causar danos no DNA.

A evidência de que o principal efeito observado neste estudo foi uma frequência aumentada de RH, é mais um alerta sobre o risco genético e ambiental imposto pelos particulados atmosféricos, já que a indução de RH está associada com a gênese de várias doenças, incluindo o câncer (Bishop e Schiestl, 2003).

4.1.2. Nitrocompostos

Com o objetivo de avaliar a toxicidade genética associada a nitrocompostos, quatro NHAPs ambientalmente importantes foram analisados no SMART. 1-Nitronaftaleno (1NN); 1,5 Dinitronaftaleno (1,5DNN); 9-Nitroantraceno (9NA) e 2-Nitrofluoreno (2NF) foram escolhidos em função da

sua ampla distribuição e concentração no ambiente, já que além de serem gerados através de processos de combustão, também são formados por reações químicas secundárias envolvendo HAPs e nitratos na atmosfera. Além do diagnóstico da toxicidade genética, o estudo também teve como objetivos a quantificação da recombinação mitótica e o cálculo da potência genotóxica de cada um dos NHAPs — uma abordagem inédita na literatura para este tipo de composto. Para a avaliação tóxico-genética foi utilizado o cruzamento aprimorado, já que estudos prévios com estes contaminantes demonstraram ausência ou diminuição na indução de clones mutantes no cruzamento padrão (Graf *et al.*, 1992; Delgado-Rodríguez *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos apontaram para efeitos positivos no genótipo trans-heterozigoto para os quatro NHAPs avaliados, produzindo aumentos estatisticamente significativos na frequência total de manchas, que representa a genotoxicidade total da amostra — indicando que estes compostos são claramente ativos neste bioensaio. Nos indivíduos heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3, apenas o 1,5DNN induziu aumentos significativos no total de manchas — mostrando que além da ação recombinacional o 1,5DNN também induz mutação. Nos demais compostos — 1NN, 9NA e 2NF — a ausência de diferenças significantes em relação aos controles negativos no genótipo heterozigoto para o cromossomo TM3 é indicativo de que a ação tóxico - genética destes NHAPs deve-se basicamente a indução de recombinação mitótica entre cromossomos homólogos. Quando os dados observados para as diferentes concentrações utilizadas foram padronizados por unidade de exposição (mM), de acordo com a metodologia descrita por Frei e Würigler (1996), foram obtidos valores referentes a potência

genotóxica dos nitrocompostos, expressos como número de manchas *mwh* induzidas em 10^5 células por 1mM de composto. Estes resultados (Tabela 2, Capítulo III), além de refletirem a potência genotóxica, também diferenciam a contribuição da recombinação mitótica e dos eventos mutacionais para a toxicidade genética dos NHAPs — quando se comparam as respostas de ambos os genótipos analisados.

Com base nestas informações fica evidente que o 1NN é o composto com a maior potência genotóxica, induzindo cerca de 10 clones / 10^5 células/ mM — seguido pelo 9NA. Observa-se também que o 1NN é cerca de 333 vezes mais genotóxico que os compostos igualmente menos potentes — 1,5DNN e 2NF. Esta diferença em termos de potência genotóxica pode ser correlacionada à presença de um grupo nitro no 1NN e de dois grupos nitro no seu correspondente 1,5 DNN — sugerindo que o primeiro é provavelmente mais acessível à transformação metabólica do que o segundo, como previamente demonstrado (Delgado-Rodríguez *et al.*, 1995). Apesar de o 1,5DNN ser considerado uma genotoxina fraca em testes com bactérias (McCoy *et al.*, 1981) no teste SMART foi tão potente quanto o 2NF — um NHAP comumente considerado como modelo para estudos de genotoxicidade e freqüentemente utilizado como controle positivo em testes de mutagenicidade. Além disto, o 2NF foi 8 vezes menos potente do que o 9NA — segunda genotoxina mais potente. No teste de Ames o 9NA e o 2NF apresentaram atividades similares induzindo 173 e 175 revertentes/ μ g respectivamente (Butterworth *et al.*, 2001). Tais diferenças podem ser explicadas pelos diferentes parâmetros avaliados em cada teste: mutação gênica no Ames e recombinação mitótica no SMART.

Com relação à proporção de recombinação mitótica — obtida pela comparação entre os dois genótipos — o 1NN foi também o mais recombinogênico (~100%) seguido pelo 2NF (~77%) e 9NA (~75%). De fato, a resposta genotóxica observada para estes três nitrocompostos mostra que o mecanismo prevalente para a indução de clones mutantes relaciona-se a ocorrência de RH. Em contraste, no que se refere a genotoxicidade total do 1,5DNN, a RH contribuiu com apenas 33%, já que os complementares 67% devem-se a eventos de mutação gênica e/ou cromossômica. Outro ponto relevante foi que os metabólitos intermediários reativos provenientes do 1NN e de seu substituto dinitro (1,5DNN) variaram em termos de mecanismos de ação sobre o DNA, já que o primeiro teve sua atividade centrada na indução de RH e o segundo induziu tanto recombinação quanto mutação. De fato, com exceção do 1NN, os demais NHAPs avaliados induziram mutação — 1,5DNN, 9NA e 2NF — confirmando resultados prévios relativos a suas ações como indutores de mutações pontuais em *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimurium* (Butterworth *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2001).

Poucas são as informações disponíveis na literatura acerca da atividade recombinogênica de NHAPs — 1NN causa incrementos na frequência de trocas entre cromátides irmãs e N-2-acetilaminofluoreno — um metabólito reativo do 2NF — induz RH em *E. coli* (Boyes *et al.*, 1991; Bichara *et al.*, 2006). A recombinação mitótica — quantificada e representada neste trabalho pela RH — foi o principal mecanismo indutor de toxicidade genética para os NHAPs — 1NN, 9NA e 2NF — e contribuiu com 33% para a genotoxicidade total do 1,5DNN. Tais dados apontam para a importância de se identificar e caracterizar a atividade genotóxica de produtos químicos específicos presentes

no ambiente, considerando os diversos tipos de lesões passíveis de serem induzidas no material genético.

4.1.3. Particulados Atmosféricos e NHAPs

Poucos são os trabalhos que identificaram as concentrações dos NHAPs presentes tanto nos particulados totais quanto nas suas frações (Calderón-Segura *et al.*, 2004), embora muitos NHAPS tenham sido identificados em frações específicas, através de linhagens especialmente construídas para a detecção desta classe de compostos (Ducatti e Vargas, 2003; De Kok *et al.*, 2005; Du Four *et al.*, 2004; Umbuzeiro *et al.*, 2008). Os NHAPs são formados em processos de combustão de substâncias químicas orgânicas ou através de reações atmosféricas envolvendo HAPs e óxidos de nitrogênio — estando incluídos entre as genotoxinas mais potentes associadas a MP.

Tanto a análise do extrato orgânico de particulados MP10 e PTS quanto a avaliação dos NHAPs individualizados, obtida através do teste SMART de asa, caracterizou a ação tóxico-genética destas amostras ou compostos. Além disto, o principal mecanismo responsável pela indução da atividade genotóxica foi a recombinação mitótica, representada pela RH. Este é um achado importante, já que existem poucas informações na literatura referentes ao potencial recombinogênico dos nitrocompostos adsorvidos na MP, bem como do extrato total. Esta afirmação está centrada na crescente confirmação do impacto dos eventos recombinacionais mitóticos sobre doenças coronarianas (Bridges *et al.*, 1990), defeitos autoimunes, diabete (Karsten e Krypsin-

Sorensen, 1988), e envelhecimento em geral (Kirkwood, 1989). A recombinação homóloga (RH) é um dos principais processos de alterações genéticas envolvidas na gênese e progressão do câncer. Neste sentido a RH funciona como um mecanismo errante de reparo de DNA que pode resultar na perda da heterozigose de genes envolvidos na regulação do ciclo celular — através da indução de conversão gênica, perda de segmentos cromossômicos e translocação — ou em rearranjos genômicos aberrantes. Estas alterações genéticas podem exercer um papel fundamental na etapa de iniciação do processo carcinogênico, mas preferencialmente estão envolvidas em etapas secundárias e subseqüentes da carcinogênese, revelando mutações recessivas. Além disto, a demonstração de que indivíduos portadores de síndromes associadas a maior predisposição para o desenvolvimento de câncer apresentam alta instabilidade genética e elevada taxa de RH, associada ao fato de que a RH ocorre mais freqüentemente em células proliferativas, estando envolvida na manutenção dos telômeros — um processo relacionado com a imortalidade de algumas células tumorais — reforçam o papel da recombinação mitótica entre cromossomos homólogos na gênese de tumores malignos (Bishop e Schiestl, 2001, 2003).

Todas estas observações validam as investigações voltadas para a caracterização dos extratos orgânicos e dos contaminantes ambientais quanto a sua ação como indutores de recombinação mitótica *in vivo*, utilizando organismos experimentais com alta similaridade genética com humanos, como é o caso da *Drosophila melanogaster*.

Em células proliferativas a RH atua desbloqueando as forquilhas de replicação, e como tal favorece o processo de replicação do DNA (Rothstein et

al., 2000). Como os HAPs e NHAPs se ligam covalentemente ao DNA, induzindo a formação de uma série de monoadições que bloqueiam o processo replicativo, pode-se explicar a alta frequência de RH — observada nas células proliferativas de *Drosophila melanogaster*, nos dois trabalhos que deram origem a esta tese. Em camundongos, Bishop *et al.* (2001) mostraram uma clara correlação entre células proliferativas e suscetibilidade a RH, induzida pela exposição ao benzo[*a*]pireno — um HAP carcinógeno frequentemente presente em extratos orgânicos de partículas aéreas. Outro ponto relevante que deve ser salientado relaciona-se aos danos oxidativos, induzidos por diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs), que contribuem de forma significativa para a ocorrência de RH (Bishop e Schiestl, 2001) — e que são induzidos pelos compostos orgânicos presentes na MP. Além disto, diversos estudos têm demonstrado que a capacidade da MP em gerar radicais livres está diretamente relacionada à indução de quebras de fita no DNA, principalmente em presença de metabolização (De Kok *et al.*, 2006) — um outro tipo de lesão preferencialmente corrigido via recombinação mitótica. O somatório destas evidências aponta para a indução de RH como um dos principais mecanismos indutores de toxicidade genética associada a MP e a alguns compostos aderidos a ela, como os NHAPs. Finalmente, a demonstração de que a indução de RH é um evento associado a diferentes etapas do processo de tumorigênese, somado a dados recentes que relacionam 10.7% dos casos de câncer de pulmão e ~1% de outros tipos de câncer a poluição aérea (Boffeta *et al.*, 2006), torna este parâmetro fundamental quando se avalia o risco genético imposto por contaminantes ambientais.

4.2. Conclusões

De acordo com os resultados dos diferentes bioensaios disponíveis na literatura, pode-se observar que de uma forma geral a adição de fração de metabolização, assim como o uso de células e organismos que detém níveis aumentados de enzimas de ativação metabólica são ferramentas mais sensíveis para a detecção da toxicidade genética associada a partículas atmosféricas. Neste sentido, os resultados obtidos no cruzamento aprimorado do teste SMART somam-se aos da literatura, demonstrando que as larvas oriundas deste cruzamento são capazes de ativar pró-mutágenos presentes em amostras ambientais.

A necessidade de identificar os compostos presentes no ambiente, principalmente adsorvidos em partículas aéreas, e caracterizar os seus perfis genotóxicos, bem como o de seus metabólitos, permitirá que se trace um cenário mais completo do risco ambiental associado a estes contaminantes. Adicionalmente, a possibilidade de associar os dados obtidos através da Genética Toxicológica às novas ferramentas na área da genômica e proteômica — através da avaliação da expressão de genes específicos e de seus produtos (Sen *et al.*, 2007) — abrem uma nova perspectiva para o entendimento dos mecanismos e das respostas em nível de DNA e proteínas induzidas por misturas complexas e seus componentes específicos — aqui representados pelas partículas aéreas e pelos NHAPs.

Capítulo V

Bibliografia Geral



5. Bibliografia Geral

Al Sabti K (1989) *Allium* test for air and water borne pollution control. Cytobios 58: 71-78.

Amaral VS, Silva RM, Reguly ML and Andrade HHR (2005) *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. Mutat Res 583: 67-74

Amaral VS, Sinigaglia M, Reguly ML and Andrade HHR (2006). Genetic toxicity in surface water from Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* Wing-Spot Test. Environ Pollut 139: 469-476.

Ames BN, Mccann J and Yamasaki E (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 31: 347-364.

Andrade HHR, Reguly ML and Lehmann M (2004) Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson DS (ed), *Drosophila* Cytogenetic Protocols. Human Press Inc., Totowa, pp 389-412.

Arutyunyan RM, Pogosyan VS, Simonyan EH, Atoyants AL and Djigardjian EM (1999) *In situ* monitoring of the ambient air around the chloroprene rubber

industrial plant using the *Tradescantia*-stamen-hair mutation assay. *Mutat Res* 426: 117-120.

Barale R, Zucconi D, Giorgelli F, Carducci AL, Tonelli M and Loprieno N (1989) Mutagenicity of airborne particles from a nonindustrial town in Italy. *Environ Mol Mutagen* 13: 227-233.

Batalha JRF, Guimarães ET, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Deur T, Carvalho HA, Alves ES, Domingos M and Rodrigues GS (1999) Exploring the clastogenic effects of air pollution in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutat Res* 426:229-232.

Beeson WL, Abbey DE and Knutsen SF (1998) Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults: results from the AHSMOF study. *Adventist Health Study on Smog. Environ Health Perspect* 106: 813-823.

Bichara M, Pinet I, Origas M and Fuchs RPP (2006). Inactivation of *recG* stimulates the RecF pathway during lesion-induced recombination in *E.coli*. *DNA Repair* 5: 129-137.

Bickham JW, Sandhu S, Hebert PDN, Chikhi L and Athwal R (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat Res* 463:33-51.

Bishop, AJR and Schiestl RH (2001) Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1471: M109-M121.

Bishop AJR and Schiestl RH (2003) Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Exp Mol Pathol* 74: 94-105.

Bishop AJR, Kosaras B, Carls N, Sidman RL and Schiestl RH (2001) Susceptibility of proliferating cells to benzo[*a*]pyrene induced homologous recombination in mice. *Carcinogenesis* 22: 641-649.

Boffetta P (2006) Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res* 608: 157-162.

Boyes BG, Rogers CG and Stapley R (1991) Genotoxicity of 1-nitronaphthalene in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res* 259: 111-121.

Bridges BA, Penn A, Hansen ES and Wakabayashi K (1990) The possible involvement of somatic mutations in the development of arteriosclerotic plaques. *Mutat Res* 239:143-188.

Buschini A, Cassoni F, Anceschi E, Pasini L, Poli P and Rossi C (2001) Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere* 44: 1723-1736.

Butterworth BE, Mathre OB and Ballinger K (2001) The preparation of anthraquinone used in the National Toxicology Program cancer bioassay was contaminated with the mutagen 9-nitroanthracene. *Mutagenesis* 16: 169-177.

Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Butterworth F and Amador-Muñoz O (2004) The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat Res* 558: 7-17.

Carvalho-Oliveira R, Pozo RM, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, Martins-Junior HÁ, Bustilho JO, Saiki M, Sato IM and Saldiva PH (2005) Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environ Research* 98: 1-7.

Černá M, Pastorková A, Vrbíková V, Smid J and Rossner P (1999) Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM₁₀) in the Czech Republic. *Mutat Res* 444: 373-386.

Černá M, Pochmanová D, Pastorková A, Beneš I, Leníček J, Topinka J and Binková B (2000) Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM₁₀ particulates. *Mutat Res* 469: 71-82.

Claxton LD and Woodall Jr (2007) A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat Res* 636:36-94.

Claxton LD, Warren S, Zweindinger R and Creason J (2001) A comparative assessment of Boise, Idaho, ambient air fine particles samples using the plate and microsuspension *Salmonella* mutagenicity assays. *Sci Total Environ* 275: 95-108.

Claxton LD, Matthews PP and Warren SH (2004) The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. *Mutat Res* 567: 347-399.

Cunha KS, Reguly ML, Graf U and Andrade HHR (2002) Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolite chemotherapeutic drugs in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 514: 95-103.

De Flora S, Bagnasco M, Izzoti A, D'Agostini F, Pala M and Valerio F (1989) Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon fractions extracted from urban air particulates. *Mutat Res* 224: 305-318.

De Kok TMCM, Hogervorst JG, Briede JJ, van Herwijnen MH, Maas LM, Moonen EJ, Drieste HA and Kleinjans JC (2005) Genotoxicity and physicochemical characteristics of traffic-related ambient particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 46: 71-80.

De Kok TMCM, Drieste HAL, Hogervorst JGF and Briede JJ (2006) Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutat Res* 613: 103-122.

De Martinis BS, Kado NY, Carvalho LRF, Okamoto RA and Gundel LA (1999) Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. *Mutat Res* 446: 83-94.

de Moraes Pantaleão S, Alcântara AV, Hora Alves Jdo P, Pavanin LA, Graf U, de Rezende AA, Valadares BL, Fragiorge EJ, de Souza NC, Guterres Zda R and Spanó MA (2007) Assessing the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen* 48: 96-105.

De Wolf H, Blust R and Bacheljau T (2004) The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutat Res* 566: 249-262.

Delgado-Rodríguez A, Ortíz-Marttelo R, Graf U, Villalobos-Pietrini R, and Gómez-Arroyo, S (1995) Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 341: 235-247.

Delgado-Rodriguez A, Ortíz-Marttelo R, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S and Graf U (1999) Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 39: 33-43.

Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM and MacNee W (2003) Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Bio Med* 34: 1369-1382.

Donnelly KC, Brown KW, Anderson CS, Barbee GC and Safe SH (1990) Metabolism and bacterial mutagenicity of binary mixtures of benzo(a)pyrene and polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Environ Mol Mutagen* 16: 238-245.

Du Four VA, Van Larebeke N and Janssen CR (2004) Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutat Res* 558: 155-167.

Ducatti A and Vargas VMF (2003) Mutagenic activity of airborne particulate matter as an indicative measure of atmospheric pollution. *Mutat Res* 540: 67-77.

Ducatti A, Mittelstaedt AB, Bringhenti L and Vargas VMF (2001) Mutagenicity of airborne particulate samples in area of influence the petrochemical complex, Rio Grande do Sul State, Brazil. *Mutat Res* 483: 79.

Englert N (2004) Fine particles and human health — a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett* 149: 235-242.

Fang GC, Chang CN, Wu YS, Fu PP, Yang DG and Chu CC (1999) Characterization of chemical species in PM_{2,5} and PM₁₀ aerosols in suburban and rural sites of central Taiwan. *Sci Total Environ* 234: 203-212.

Fearon ER and Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

Frei H and Würzler FE (1996) Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11: 315-325.

Frölich A and Würzler FE (1990a) Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res* 244: 201-208.

Frölich A and Würzler FE (1990b) *Drosophila* wing spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic hydrocarbons. *Mutat Res* 234: 71-80.

Gábelová A, Valvovicová Z, Horváthová E, Slamenová D, Binková B, Sram RJ and Farmer PB (2004) Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia. *Mutat Res* 563: 49-59.

Graf U (1995) Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51: 168-173.

Graf U and Singer D (1989) Somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster* (wing spot test): effects of extracts of airborne

particulate matter from fire-exposed and non fire-exposed building ventilation filters. *Chemosphere* 19: 1094-1097.

Graf U and Singer D (1992) Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. *Rev Int Contam Ambient* 8: 15-27.

Graf U and van Schaik N (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271: 59-67.

Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 6: 153-188.

Graf U, Wild D and Würigler FE (1992) Genotoxicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ) and related compounds in *Drosophila*. *Mutagenesis* 7: 145-149.

Guimarães ET, Domingos M, Alves ES, Caldini Jr N, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC and Saldiva PHN (2000) Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia* – micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ Exp Bot* 44: 1-8.

Hamers T, Van Schaardenburg MD, Felzel EC, Murk AJ and Koeman JH. (2000) The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. *Sci Total Environ* 262: 159-174.

Hoffmann GR, Janel-Bintz R and Fuchs RPP (2001) Induction of 2 frameshift mutations by 2-nitrofluorene, *N*-hydroxyacetylaminofluorene, and *N*-2-acetylaminofluorene in reversion assays in *Escherichia coli* strains differing in permeability and acetyltransferase activity. *Mutat Res* 493: 127-137.

Hsiao WL, Mo ZY, Fang M, Shi XM and Wang F (2000) Cytotoxicity of PM (2.5) and PM (2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutat Res* 471: 45-55.

Isidori M, Ferrara M, Lavorgna M, Nardelli A and Parrella A (2003) In situ monitoring of urban air in southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membranes devices (SPMDS). *Chemosphere* 52: 121-126.

Kado NY, Guirguis GN, Flessel CP, Chan RG, Chang K and Wesolowski JJ (1986) Mutagenicity of fine (<2,5µm) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ Mol Mutagen* 8: 53-66.

Karsten W and Krypsin-Sorensen I (1988) Penetrance and low concordance in monozygotic twins in disease: are they the result of alterations in somatic genomes? *Molec Reprod Dev* 1: 63-75.

Kim JK, Shin HS, Lee JH and Lee JJ (2003) Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay and by chemical analysis. *Mutat Res* 541: 55-61.

Kirkwood TBL (1989) DNA, mutants and ageing. *Mutat Res* 219: 1-8.

Kretzschmar JG (1994) Particulate matter levels and trends in Mexico City, São Paulo, Buenos Aires and Rio de Janeiro. *Atmos Environ* 28: 3181-3191.

Kuo CY, Cheng YW, Chen CY and Lee H (1998) Correlation between the amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung City, Taiwan. *Environ Res* 78: 43-49.

Lehmann M, Franco A, Vilar KS, Reguly ML and Andrdæ HHR (2003) Doxorubicin and its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 539: 166-175.

Lewtas J, Chuang J, Nishioka M and Peterson B (1990) Bioassay-directed fractionation of the organic extract of SRM 1649 urban air particulate matter. *Int J of Environ Anal Chem* 39: 245-254.

Ma TH, Anderson VA and Ahmed I (1982) Environmental clastogens detected by meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. In: Tice RR, Costa DL and Schaich KM (eds) Genotoxic Effects of Airborne Agents. Environmental Science Research 25. Plenum Press, New York, pp 141-157.

Ma TH, Cabrera GL and Owens E (2005) Genotoxic agents detected by plant bioassays. Rev Environ Health 20: 1-13.

McCoy EC, Rosenkranz EJ, Petruzzo LA, Rosenkranz HS and Mermelstein S (1981) Structural basis of the mutagenicity in bacteria of nitrated naphthalene and derivatives. Environ Mol Mutagen 3: 499-511.

Misik M, Solenska M, Micieta K, Misikova K and Knasmuller S (2006) In situ monitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays. Mutat Res 605: 1-6.

Misik M, Micieta K, Solenska M, Misikova K, Pisarcikova H and Knasmuller S (2007) In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia* micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emissions controls in an eastern European city. Environ Pollut 145: 459-466.

Monarca S, Feretti D, Zanardini A, Falistocco E and Nardi G (1999) Monitoring of mutagens in urban air samples. Mutat Res 426: 189-192.

Monn C and Becker S (1997) Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol* 155: 245-252.

Motta S, Federico C, Saccone S, Librando V and Mosesso P (2004) Cytogenetic evaluation of extractable agents from airborne particulate matter generated in the city of Catania (Italy). *Mutat Res* 561: 45-52.

Munerato MC, Sinigaglia M., Reguly ML and Andrade HHR (2005). Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 582: 87-94.

Naeher LP, Holford TR, Beckett WS, Belanger K, Triche EW, Bracken MB and Leaderer BP (1999) Healthy women's PEF variations with ambient summer concentrations of PM₁₀, PM_{2.5}, SO₄, H, and O₃. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 117-125.

Pastorková A, Cerná M, Smid J and Vrbikova V (2004) Mutagenicity of airborne particulate matter PM₁₀. *Cent Eur J Public Health* 12 (Suppl): S72-S75.

Plewa MJ, Weaver DL, Blair LC and Gentile JM (1983) Activation of 2-aminifluorene by cultured plant cells. *Science* 219: 1427-1429.

Poli P, Buschini A, Restive FM, Ficarelli A, Cassoni F, Ferrero I and Rossi C (1999) Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in

human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis* 14: 547-556.

Poma A, Arrizza L, Picozzi P and Spano L (2002) Monitoring urban air particulate matter (fractions PM 2.5 and PM10) genotoxicity by plant systems and human cells in vitro: a comparative analysis. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 22: 271-284.

Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K and Thurston GD (2002) Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287: 1132-1141.

Rajaguru P, Kalpana R, Hema A, Suba S, Baskarasethupathi B, Kumar PA and Kalaiselvi K (2001) Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the comet assay. *Environ Mol Mutagen* 38: 316-322.

Rodrigues F, Lehmann M, do Amaral VS, Reguly ML and Andrade HHR (2007) Genotoxicity of three mouthwash products, Cepacol, Periogard and Plax, in the *Drosophila* wing-spot test. *Environ Mol Mutagen* 48: 644-649.

Rothstein R, Michel B and Gangloff S (2000) Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev* 14: 1-10.

Saldiva PHN and Böhm GM (1998) Animal indicator of adverse effects associated with air pollution. *Ecosys Health* 4: 230-235.

Sato MI, Valent GU, Coimbra CA, Coelho MC, Sanchez P, Alonso CD and Martins MT (1995) Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. *Mutat Res* 335: 317-330.

Scarpato R, Di Marino F, Strano A, Curti A, Campagna R, Loprieno N, Barrai I and Barale R (1993) Two years' air mutagenesis monitoring in a northwestern rural area of Italy with an industrial plant. *Mutat Res* 319: 293-301.

Sen B, Mahadevan B and De Marini DM (2007) Transcriptional responses to complex mixtures — a review. *Mutat Res* 636: 144-177.

Sevastyanova O, Binková B, Topinka J, Sram RJ, Kalina I, Popov T, Novakova Z and Farmer PB (2007) In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles part II: human cell lines. *Mutat Res* 620: 123-134.

Soares SR, Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Rivero DH, De Castro I, Garcia ML and Saldiva PH (2003) Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. *Environ Res* 92: 191-196

Somers CM, Mc Carry BE, Malek F and Quinn JS (2004) Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science* 304: 1008-1010.

Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen LE and Loft S (2003) Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* 544: 255-271.

St. John MAR and Xu T (1997) Insights from model systems – understanding human cancer in a fly? *Am J Hum Genet* 61: 1006-1010.

Tickoo S and Russel S (2002) *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Curr Opin Pharmacol* 2:555-560.

Topinka J, Schwarz LR, Wiebel FJ, Černá M and Wolff T (2000) Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part II. DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat Res* 469: 83-93.

Umbuzeiro GA, Franco A, Martins MH, Kummrow F, Carvalho L, Schmeiser HH, Leykauf J, Stiborova M and Claxton LD (2008) Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, Nitro-PAH, and Oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. *Mutat Res*: In Press.

US Environmental Protection Agency (1996) Air quality criteria for particulate matter. EPA, 600/P-95/001aF.

Vargas VMF, Horn RC, Guidobono RR, Mittelstaedt AB and de Azevedo IG (1998) Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. *Genet Mol Biol* 21: 1-12.

Vinitketkumnue U, Kalayanamitra K, Chewonarin T and Kamens R (2002) Particulate matter, PM10 & PM2.5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutat Res* 519: 121-131.

White PA and Rasmussen JB (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat Res* 410: 223-236.

Zhao X, Wan Z, Chen G, Zhu H, Jiang S and Yao J (2002) Genotoxic activity of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. *Mutat Res* 514: 177-192.