

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE INDUZIDA POR EMISSÕES DE
VEÍCULOS AUTOMOTORES – *Ctenomys minutus* COMO
ORGANISMO BIOINDICADOR**

Vanina Dahlström Heuser

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientador: Thales R. O. de Freitas

Co-orientadora: Juliana da Silva

Porto Alegre 2001

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

Albert Einstein (1879-1955)

Àqueles animais que, em nome da ciência,
são sacrificados ou lesados.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade federal do Rio Grande do Sul, subvencionado por: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX).

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos sinceros:

Inicialmente, à Renata Medina e Leonardo Teixeira, pessoas maravilhosas que, no final do seus mestrados, época em que o tempo é tão valioso, se dispuseram a dar aulas ao nosso pequeno grupo de estudo para a prova de seleção de mestrado neste programa;

Aos amigos e colegas da sala 101 e 103, Cristina C. Freygang, Vanessa Moraes de Andrade, Camila Moraes, Camila Castilho, Tarik El Jundi, Gabriela Fernândes, Elise Giacomoni, Jorge Marinho, Adriana Gava, Daniel Prá, Lucas Klassmann, Lúcia Andréia de Oliveira, Cristina Flores, Lúgia Tchaicka e Leandro Jerusalinsky, pela amizade, alegria e companheirismo deste grupo tão especial;

Aos colegas de laboratório, em especial Luciano de Souza Silva, Jaqueline Andrade Miranda e Taiana Haag, pela amizade e boa companhia;

Ao Dr. Bernardo Erdtmann pelo apoio e pela disponibilidade em me ajudar sempre que foi preciso;

Ao Engenheiro Guilherme Burkhart (CONCEPA) pelas informações sobre o fluxo de veículos no pedágio em Santo Antônio;

Ao Sr. Belmiro Weber, Zeferino Amaral e Marcelo Borsato, por permitirem que as coletas fossem realizadas em suas propriedades;

À Dra. Luiza Reis e ao Oitavo Distrito de Meteorologia, Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), pelo acesso aos dados meteorológicos da região de estudo;

À Ana, Silvana e Clênio, pelo auxílio na obtenção do sangue controle para os testes;

Aos companheiros de saídas de campo, em especial Carlos Ferreira, Ana Amélia, Jaqueline, Isabel e Míriam, pela ajuda e pela companhia divertida em trabalho;

Ao Prof. Altair, Janete e André do laboratório de Altas pressões do Instituto de Física, e aos Drs. Fernando C. Zawislak, Johnny F. Dias e Maria Lúcia Yoneama do Laboratório de Implantação Iônica, pela ajuda no preparo e análise de metais;

À Heinz-Jörn Moriske, da Agencia Federal Ambiental de Berlim pelo envio e análises dos amostradores de dióxidos de nitrogênio;

Ao Elmo Jurandir Cardoso, pela amizade e paciência; Lucia Pacheco, Virgínia e Ellen, pela amizade e auxílio;

À Ana Paula Lebout, Renata Freitas, John Steve Carpenter e Åsa Heuser pelas revisões de inglês e português;

Aos meus grandes amigos e grandes orientadores, Drs. Thales R. O. de Freitas e Juliana da Silva, pela amizade, orientação e apoio na realização deste trabalho;

E, finalmente, às pessoas mais importantes da minha vida: ao Beto, pelo apoio e carinho, e toda minha família, pelo amor e apoio de sempre.

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Toxicologia Ambiental	8
1.2. Emissões Veiculares	10
1.3. Estudos e Efeitos da Contaminação Atmosférica	12
1.4 Metodologias Utilizadas neste Estudo	17
1.5. Organismo Bioindicador: <i>Ctenomys minutus</i>	22
1.6. Caracterização do Ambiente Estudado	23
2. OBJETIVOS	25
3. GENOTOXICITY BIOMONITORING IN REGIONS EXPOSED TO MOTOR VEHICLE EMISSIONS USING NATIVE RODENT <i>CTENOMYS MINUTUS</i> BY COMET ASSAY AND MICRONUCLEUS TEST	26
4. DISCUSSÃO GERAL	65
5. RESUMO E CONCLUSÕES	71
6. SUMMARY AND CONCLUSIONS	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Toxicologia Ambiental

A toxicologia ambiental é considerada uma ciência multidisciplinar embasada em diversas áreas de estudo, tais como: a biologia, química, anatomia, genética, fisiologia, microbiologia, ecologia, ciências do solo e água, ciências atmosféricas, epidemiológicas, econômicas, jurídicas e outras. Este campo de estudo é relativamente jovem em relação a outros, mas reconhecidamente de importância atual. Essa nova ciência diverge das que utilizam testes tradicionais farmacológicos e toxicológicos, que testam organismos únicos e utilizam métodos de laboratório para indicar relativa toxicidade dos vários componentes. Ao invés disso, a toxicologia ambiental ou ecotoxicologia aborda questões mais complexas, como por exemplo: os contaminantes são alterados depois de sua liberação ao ambiente? Como os organismos são expostos? Como as alterações fisiológicas geradas impactam a dinâmica e a estrutura das populações? Que impacto indireto ocorre aos organismos não expostos quando suas presas, predadores ou competidores são afetados? Quanto o impacto de múltiplos componentes difere da ação de componentes isolados? Estas questões estão além do domínio de um organismo, ou de um teste de laboratório (Yu, 2001).

Durante as últimas três décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e das agências reguladoras em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas. Este interesse tem se intensificado por aumentos assustadores de relatos sobre os danos na camada de ozônio, mudanças climáticas globais, liberações acidentais de dejetos e gases radioativos industriais, aumento do nível de nitrogênio no ambiente e vazamentos de óleo. O crescimento da população humana e de suas atividades associadas com a agricultura, industrialização e comércio ainda contribuem para a depredação da biodiversidade e variabilidade genética, tendo como consequência extrema a extinção de muitas espécies (Vituosek e cols., 1997).

A biodiversidade pode ser definida como número, variedade e variabilidade dos organismos vivos dentro de uma escala temporal e espacial. Isto existe como algo contínuo, incluindo grupos taxonômicos (gêneros, famílias, etc.), espécies, populações,

subpopulações, indivíduos e genes. Um desequilíbrio genético nestes níveis tem um efeito direto no declínio da biodiversidade, aumentando conseqüentemente a vulnerabilidade ao estresse ambiental e a extinção de espécies (Bowen, 1999). Tanto a extinção como a evolução das espécies fazem parte da história da vida na terra. Apesar disso, devido à destruição acelerada de habitats naturais, intensificação da agricultura e poluição química, a proporção atual de extinções está estimada de 10 a 100 vezes maior que o histórico conhecido (Bickham e cols., 2000).

Embora existam dificuldades em se estabelecer ligações diretas entre os efeitos ecológicos e a saúde humana, o uso de espécies selvagens como sentinelas dos problemas ambientais é a base para esta conexão (Colborn, 1994). A comunidade científica como um todo admite hoje que a saúde humana depende da saúde ambiental, e que a contínua degradação desta ameaça a qualidade de vida. Estudos demonstram, por exemplo, que muitos elementos químicos agem no sistema endócrino, e que, nas últimas décadas, a viabilidade espermática humana declinou em torno de 50% em países industrializados (Auger e cols., 1995). Tais achados tornam evidente o impacto de certos agentes na vida selvagem e na saúde humana.

A mudança na variabilidade genética e frequências alélicas das populações como resultados das mutações, o efeito “gargalo-de-garrafa” e a seleção causados direta ou indiretamente pela exposição a agentes ambientais são efeitos que tomam menor atenção por parte dos toxicologistas. Estes estudos compõem o que é hoje conhecido como Toxicologia Evolutiva. Um número maior de investigações nesta área se fazem necessárias (Yu, 2001).

Os impactos causados por agentes tóxicos no ambiente e saúde humana muitas vezes não podem ser observados e medidos diretamente, assim as análises de risco é que nos permitem estimar e comparar estes impactos. A análise de risco é a medida e a comparação entre as diferentes formas de risco, o gerenciamento destes envolve técnicas utilizadas para diminuir os possíveis impactos. A caracterização de riscos à saúde pode levar um longo tempo. A maioria dos tumores crescem muito lentamente e são detectados somente muitos anos ou mesmo décadas após a exposição do organismo ao possível agente carcinógeno. O tempo entre a exposição ao fator de risco e a expressão do efeito adverso denomina-se período de latência. Em tumores de adultos, o período de latência parece ser de dez a quarenta anos e a relação entre a exposição e o efeito é difícil de ser estabelecida da maioria dos casos (Peirce e cols., 1998). Em experimentos com animais são identificados muitos carcinógenos, mas não é possível fazer a extrapolação destes

resultados para humanos com 100% de segurança. O EPA, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (1995), classifica substâncias conhecidamente carcinógenas em animais, mas sem evidências suficientes sobre seu efeito carcinogênico em humanos, como “possíveis” carcinógenos em humanos.

A questão ambiental é vista pelos novos parâmetros curriculares do Ministério da Educação e Cultura como um conjunto de problemas relativos não só a proteção da vida no planeta, mas também a melhoria do meio ambiente e da qualidade de vida das comunidades, passando a ser prioridade estratégica para o planejamento político e econômico de todos os países (MEC, 2001).

1.2. Emissões Veiculares

A emissão de gases tóxicos e de material particulado na atmosfera vêm crescendo em quase todas as grandes aglomerações urbanas e industriais do mundo, afetando não só a qualidade local do ar, mas produzindo efeitos que se manifestam a grandes distâncias e a longo prazo. Veículos e indústrias são dois dos maiores produtores dos agentes da poluição (CETESB, 1996).

A exposição às emissões provenientes dos motores dos veículos tem sido considerada preocupante pelos seus efeitos à saúde humana (IARC, 1989). Nas cidades, os automóveis são responsáveis por mais da metade da poluição do ar, já que os gases produzidos pelos motores, através da combustão, contém poluentes diversos sabidamente genotóxicos, como óxidos de nitrogênio (NO_x), monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SO_x), hidrocarbonetos (HC) e seus derivados, bem como particulados (CETESB, 1992) e metais (cádmio, cromo, cobre, níquel, vanádio, zinco e chumbo) (Freedman, 1995). Todos esses compostos isolados ou associados a outros elementos são tóxicos ou de efeito danoso aos organismos, de forma não totalmente esclarecida (Missini & Lombi, 1997).

Fenômenos meteorológicos determinam a dispersão e o movimento dos contaminantes pela atmosfera. A força predominante no transporte dos poluentes são os ventos (Peirce e cols., 1998), que juntamente com as chuvas provocam a precipitação desses elementos, contaminando as águas e o solo, bem como colocando em risco a vida humana e o meio ambiente, devido ao efeito cumulativo (CETESB, 1996).

O EPA (1994a) atribui às substâncias tóxicas emitidas pelos carros metade dos casos de câncer causados por substâncias presentes no ar. Não é sem razão que um relatório da Organização Mundial de Saúde, publicado em 1972, conforme CETESB (1996), mostrou que as cidades se tornaram perigosos "focos cancerígenos", ou seja, as populações urbanas contraem câncer com mais freqüência que as rurais.

A característica dos gases e materiais particulados emitidos pelos automóveis depende da eficiência do motor na queima do combustível e da qualidade deste. Na gasolina convencional existem mais de mil compostos diferentes, sendo que muitos dos constituintes primários da gasolina são conhecidos como prováveis carcinógenos. A queima deste combustível, segundo Huisingh (1980), resulta na emissão de milhares de componentes que, de acordo com os estudos de Hadnagy e cols. (1988) apresentam propriedades citotóxicas e genotóxicas. Conseqüentemente, programas para controle da qualidade do ar concentram-se nas modificações da qualidade dos combustíveis e em novas tecnologias na engenharia dos veículos (Mage & Zali, 1992). Fazem-se necessárias medidas de controle, devido ao grande aumento de veículos, principalmente nas grandes cidades (Crebelli e cols., 1995).

Uma medida importante para o controle da qualidade do ar, tomada em 1995, foi a criação da "Gasolina Reformulada (RFG)", com a adição de um produto que incorpora um átomo de oxigênio aos demais componentes, para promover uma queima mais completa nos motores. A maioria das empresas escolheu o MTBE (éter metiltertibutílico), que reduz as emissões de monóxido de carbono e dilui os componentes primários da gasolina, como benzeno e tolueno. Entretanto, segundo o EPA (1995), o MTBE é considerado um possível causador de câncer em humanos, sendo já comprovado em animais. Também existe relação entre altos níveis de MTBE no sangue de pessoas expostas e o agravamento de problemas de saúde, principalmente nas vias respiratórias (EPA, 1994b).

No Brasil ainda é grande o número de carros movidos a álcool. Com este tipo de combustível também ocorre redução nas emissões de hidrocarbonetos e monóxido de carbono, quando comparado à gasolina. No entanto, gera aumento na produção de aldeído, em particular o formaldeído, que também apresenta efeitos genotóxicos (Restani & Galli, 1991).

Dentre as inúmeras medidas de controle já tomadas, talvez a mais importante tenha sido a retirada do chumbo da gasolina, a partir de 1970, por ser uma substância altamente tóxica (EPA, 1994b). O chumbo apresenta resultados controversos na literatura, sendo que se este tem algum efeito no processo genético, isto ocorre mediante mecanismos indiretos

(Winter & Bonin, 1993), como a inibição do reparo do DNA (Hartwing e cols., 1990). No entanto, muitos estudos têm documentado a distribuição de metais pesados no solo, vegetação e no ar ao longo de transectos perpendiculares a movimentadas rodovias, dentre eles o chumbo e outros. Dentre estes o cádmio e níquel, classificados como carcinogênicos pela Agência Internacional de pesquisa do Câncer (IARC, 1989); e cobre, vanádio e zinco (Allen, 1989; Freedman, 1995), que isolados ou com efeito sinérgico com outros agentes, são considerados como parte de um grupo potencialmente mutagênico presente no ambiente (Minissi & Lombi, 1997). Aos elementos traço como o vanádio, cobre e cádmio têm se atribuído a toxicidade encontrada nas partículas urbanas, por causarem danos oxidativos em células pulmonares (Ghio e cols., 1996).

Além dos metais, outras substâncias também são volatilizados em altas temperaturas de combustão. Dos componentes orgânicos voláteis gerados com a queima de combustíveis fósseis, destacam-se os hidrocarbonetos, dos quais os mais perigosos são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), formados quando o material orgânico é submetido a processos piróticos de combustão incompleta. Os HAP são muito resistentes a degradação devido a sua complexa estrutura e, como resultado, têm a propriedade de participar de várias reações atmosféricas antes de serem degradados o suficiente para serem removidos do ambiente (Yu, 2001). Por encontrarem-se primariamente associados à fração inalável da matéria particulada em suspensão, e devido ao seu potencial carcinogênico, sugere-se que os HAP são os maiores contribuidores para qualquer efeito carcinogênico associado a poluição atmosférica (Kyrtopoulos e cols., 2001). O metabolismo *in vivo* destes compostos pode resultar na produção de metabólitos eletrofílicos que se ligam de forma covalente ao DNA (Balch e cols, 1995). Outros trabalhos demonstram correlação positiva entre exposição a HAP e níveis de adutos de DNA em glóbulos brancos de pessoas expostas a poluição atmosférica (Kyrtopoulos e cols., 2001). Além disso, estudos mostram que a toxicidade dos HAP é aumentada através de fotoreações na presença de luz solar, gerando poluentes secundários (Huang e cols., 1995), como os nitroderivados (quando associados aos NO_x) (Kupra & Legge, 2000; Pereira-Neto e cols., 2000). Os HAP são considerados pelo IARC como carcinogênicos em animais. Segundo Hasspieler e cols. (1995) os HAP são considerados tóxicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos, ocasionando quebras simples no DNA. Assim, devido as suas características, se determinou em nível internacional a inclusão de 16 hidrocarbonetos na lista dos poluentes orgânicos prioritários para controle pela U. S. Environmental Protection Agency (EPA).

1.3. Estudos e Efeitos da Contaminação Atmosférica

A contaminação da atmosfera em grandes centros urbanos causa efeitos adversos na saúde da população exposta. Estudos epidemiológicos freqüentemente têm demonstrado um aumento dos níveis de poluição associados aos acréscimos nos números de doenças em humanos e na taxa de mortalidade (Saldiva & Böhm, 1998). Aproximadamente 30% do total de mortalidade em diversos países industrializados é devido ao câncer (Peirce e cols., 1998).

Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado que o câncer de pulmão é mais comum em áreas urbanas que em áreas rurais. A presença de substâncias carcinogênicas no ar urbano e o aumento de alterações cromossômicas em pessoas expostas a condições de tráfego intenso suportam esta hipótese. Em um experimento em que se utilizou camundongos para verificar o efeito carcinogênico do ar poluído, quatro grupos de animais foram expostos a diferentes ambientes: com ar puro, ar com uretano (um potente carcinógeno), poluição aérea isolada e poluição aérea com uretano. Os camundongos expostos ao ar poluído com o carcinógeno foram mais propensos ao desenvolvimento de câncer de pulmão em comparação com os camundongos expostos ao ar com uretano e poluição aérea isolada (Reymão e cols., 1997). Este resultado mostra que a poluição do ar pode ser considerada um promotor, mas não iniciador de câncer.

A maior dificuldade que se tem em monitorar a poluição ambiental se dá devido aos organismos na natureza estarem expostos a misturas complexas, e não a um único agente. A toxicidade é também freqüentemente considerada em termos de efeito de químicos isolados em organismos específicos. Apesar do progresso feito no desenvolvimento de modelos preditivos sobre a toxicidade de componentes químicos, previsões sobre a toxicidade de misturas químicas ainda devem ser realizadas. Isto é em parte devido à enorme complexidade dos efeitos que essas misturas podem causar em sistemas vivos. Além disso, a genotoxicidade das misturas pode ser sinergicamente aumentada quando comparada com a genotoxicidade dos componentes testados individualmente (DeMarini, 1998). Portanto, existe uma necessidade crítica de se avaliar os efeitos biológicos das misturas químicas. Fatores ambientais também influenciam os monitoramentos ambientais, tais como temperatura, pH, umidade, e outros, que podem afetar a toxicidade dos poluentes por diferentes meios. Quando se estuda animais e humanos, características individuais como fatores genéticos/suscetibilidade, idade, condições de saúde, comportamento, sexo e fatores nutricionais também influenciam os resultados das avaliações (Yu, 2001). Sistemas biomarcadores e organismos testes cuidadosamente selecionados (ou apropriadamente

modificados) podem proporcionar monitoramentos mais rápidos e econômicos da toxicidade de misturas complexas às quais estamos expostos (Butterworth e cols., 1995).

O sistema respiratório é o alvo preferencial para contaminantes atmosféricos. Então, alterações funcionais de algumas propriedades básicas da homeostase respiratória representam um bom estimador de um eventual dano induzido pela poluição atmosférica. Em um estudo com ratos mantidos por períodos prolongados numa área poluída da cidade de São Paulo, e usando animais mantidos pelo mesmo tempo em ambiente limpo como controles, a exposição crônica ao ar poluído prejudicou de forma significativa as propriedades físicas do trato respiratório, tornando os animais expostos mais predispostos a infecções pulmonares. Anormalidades estruturais dos cílios das vias aéreas foram demonstrados por outras investigações em animais sentinelas, indicando que a exposição crônica a poluição do ar é responsável por esses problemas (Saldiva & Böhm, 1998). Estes resultados suportam o conceito de que alterações no trato respiratório são bons indicadores da qualidade do ar, e a análise em espécies sentinelas é um sensível indicador de dano por poluição (Lemos e cols., 1994; Saldiva & Böhm, 1998). No entanto, em outro trabalho com ratos, demonstrou-se que nos animais expostos em laboratório a emissões de diesel, a indução de câncer só ocorre quando a concentração é muito alta (Valberg & Crouch, 1999).

Os efeitos potenciais da poluição do ar na saúde não são exclusivos do sistema respiratório. Provavelmente, a análise mais sensível para se testar os efeitos adversos da poluição, pode ser representada por testes de neurocomportamento. Com o desenvolvimento de testes sensíveis com animais para se quantificar capacidades de aprendizagem e mudanças no comportamento normal, os efeitos da poluição do ar podem ser melhor avaliados. Desta forma, se elimina fatores confusos inerentes a seres humanos que vivem em centros urbanos (Johnson, 1993).

Considerando tudo isso, a idéia de se usar um modelo animal como uma espécie sentinela para detectar as falhas encontradas nos estudos epidemiológicos convencionais, bem como análises químicas insuficientes, parece razoável. Um controle mais adequado de condições de exposição combinado com a possibilidade do uso de procedimentos invasivos como histopatológicos, funcionais e estudos moleculares, podem ser obtidos em estudos com animais para investigação dos efeitos da poluição (Saldiva e Böhm, 1998).

Organismos sentinela, também conhecidos por biomonitores, vêm sendo utilizados a muito tempo no que diz respeito a alertar as pessoas sobre ambientes perigosos. O uso de canários para detectar monóxido de carbono em antigas minas romanas é um bom exemplo para ilustrar e definir o princípio dos biomonitores. Estes pequenos pássaros respondiam

mais rapidamente a toxicidade do monóxido de carbono que os mineiros, e podiam ser utilizados para uma contínua vigilância (Butterworth e cols., 1995). Assim, pode-se considerar a observação de animais nativos ou domésticos “envenenados” como indicadores iniciais da potencialidade do ambiente em causar danos a saúde humana.

Muitos tipos de organismos são utilizados como sentinelas para se avaliar possíveis efeitos de riscos naturais ou de origem antropogênica. Em ambientes aquáticos, algas, insetos, moluscos, vermes bênticos, esponjas, anfíbios e peixes têm sido utilizados como organismos monitores de toxicidade de poluentes (Butterworth e cols., 1995; Cotelle & Féraud, 1999; Bickham e cols., 2000). Plantas, particularmente a *Tradescantia*, *Allium cepa* e *Vicia faba*, tem sido utilizadas para avaliação da poluição presente tanto na água quanto na atmosfera (Gómez-Arroio & Villalobos-Petrini, 1995; Ma, 1995). Espécies de mamíferos vivendo próximos ao homem também têm sido usados como biomonitores, como por exemplo o rato doméstico (*Mus domesticus*) no monitoramento de locais contaminados com herbicidas e dejetos industriais e urbanos (Petras e cols., 1995). Geralmente espécies selvagens são utilizadas como bioindicadores de risco ecológico, enquanto que animais domésticos são mais úteis na avaliação de risco à saúde humana. Para avaliação de exposição crônica tem se observado o uso de roedores nativos. Por exemplo, em camundongos selvagens (*Mus musculus*) foi demonstrado haver associação entre a proximidade com áreas industriais e o aumento de danos genotóxicos em células de medula óssea, bem como aumento no número de troca de cromátides irmãs e de micronúcleos (Talmage & Walton, 1991). Outro exemplo de animais nativos no biomonitoramento são os Tuco-tucos, os quais demonstraram sensibilidade suficiente na detecção de danos ao DNA causados por exposição ao carvão (Silva e cols., 2000a; 2000b; 2000c). Nestes estudos através do Teste de micronúcleos e Ensaio Cometa foi possível avaliar a genotoxicidade sem ser necessário o sacrifício dos animais, possibilitando um biomonitoramento a longo prazo, comparando-se as respostas por sexo, idade e estação do ano. Outros trabalhos ainda tem proposto o uso de animais de estimação e animais de fazenda, como bovinos, porcos e cavalos, para se detectar a exposição à poluição. Um bom exemplo é o trabalho de Ahmed e cols. (1998) que avaliou búfalos expostos à atmosfera com resíduos industriais e a emissões de automóveis, onde se observou aumento significativo de aberrações e quebras cromossômicas em linfócitos de sangue periférico quando comparados aos animais da área rural.

As aves são uma excelente alternativa para se estudar a distribuição espacial da poluição por elementos traço devido ao alcance de seu vôo. Análises em ovos de gaiota foram empregados com sucesso na avaliação da forma de distribuição espacial de certos

contaminantes, como os metais pesados, na cidade de Nova York. As penas mostraram-se eficazes na avaliação das concentrações de metais pesados como mercúrio, chumbo e cádmio (Saldiva & Böhm, 1998). Também a avaliação de níveis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em ovos de falcões peregrinos, tanto em regiões da Califórnia como Canadá, são importantes evidências quanto ao uso de pesticidas organoclorados, os quais já teriam sido banidos da agricultura. Estes agentes estão intimamente relacionados com genotoxicidade, bem como com o sucesso reprodutivo desta espécie (Bickham e cols., 2000). Um monitoramento com aves bioindicadoras foi realizado em Amsterdã, onde se expôs grupos de pombos a quatro áreas com diferentes densidades de tráfego de automóveis. A constituição da gasolina com chumbo foi evidenciada nas análises de metais no sangue dos animais, que variavam de acordo com o maior ou menor tráfego de automóveis. Além do chumbo, o cádmio também foi encontrado em altas concentrações em todos os tecidos analisados, enquanto um aumento estatisticamente significativo das concentrações de zinco foi observado somente no sangue das aves coletadas nos dois locais mais movimentados da cidade. O dano oxidativo foi observado no fígado dos pombos coletados nas áreas mais movimentadas, com correlação negativa às concentrações de zinco, mostrando o efeito protetor deste metal em relação a este tipo de dano (Peirce e cols., 1998).

Testes de genotoxicidade no monitoramento de populações humanas são de máxima importância para o conhecimento e prevenção de doenças públicas e ocupacionais. O trabalho de Hadnagy & Seemayei (1988) demonstrou que as partículas de gás, emitidas pelos motores, podem induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos. Hogsted (1991) detectou um aumento significativo de micronúcleos em atendentes de bombas de gasolina, do mesmo modo que Gattás e cols.(2001), com trabalhadores de postos de combustível em São Paulo, e Santos-Mello & Cavalcante (1992) encontraram um aumento significativo de deleções cromossômicas estudando atendentes de postos de gasolina do Rio de Janeiro e de São Paulo.

Estudos em populações de locais industrializados e intensamente trafegados também mostram clara evidência de efeitos genotóxicos da poluição por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, com aumento de adutos de DNA em linfócitos e células da mucosa bucal, aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs (Wesp e cols., 2000), *HPRT* e mutações no oncogene *rás* (Wesp e cols., 2000; Kyrtopoulos e cols., 2001). Outro estudo, com vendedores de jornal e policiais rodoviários nas ruas movimentadas da Itália, mostrou haver aumento de adutos de DNA associado com a intensidade do tráfego de automóveis (Kyrtopoulos e cols., 2001).

Baseando-se em todos estes achados, faz-se necessário que se ponha em prática projetos de monitoramento da qualidade do ar e dos efeitos que os poluentes derivados da queima de combustíveis têm sobre os seres vivos expostos e ambiente. Também é importante salientar que, segundo Rabl & Spadaro (1999) e Zmirou e cols. (1999), os custos para tratamentos de doenças respiratórias causadas por poluição atmosférica superam os gastos com a prevenção.

1.4. Metodologias Utilizadas neste Estudo

A avaliação do potencial genotóxico (ou mutagênico) de um agente químico isolado é realizada utilizando estudos que abrangem organismos procarióticos e eucaróticos, com testes *in vitro* e *in vivo*. Os primeiros estudos devem ser, preferencialmente, realizados *in vitro*, e conforme os resultados obtidos, são então recomendados ensaios mais específicos *in vitro* e *in vivo*.

A identificação e caracterização dos danos genotóxicos vêm se desenvolvendo continuamente. Dependendo do tipo de danos que se quer detectar são necessários diferentes testes. São conhecidos centenas destes, mas dificilmente são viáveis ou mesmo necessários em grande número para fazer a avaliação do potencial genotóxico. Os métodos que são mais amplamente empregados para detecção de mutações gênicas são aqueles que utilizam as bactérias (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*). Estes são relativamente simples, reproduzíveis e dão resultados confiáveis de interação do produto com o DNA e seu efeito. Contudo, as bactérias são organismos simples, e os resultados obtidos nem sempre são válidos para células de eucariotos. Para se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos há testes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em células de culturas de mamíferos ou mesmo mutações somáticas em mamíferos pelo teste de HGPRT (gene de hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase, ligado ao cromossomo X dos mamíferos), ou o “mouse spot test” (alteração da cor do pelo em camundongos tratados durante a embriogênese) (Tice e cols., 1988). O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática - SMART - em células de *Drosophila melanogaster*, além de utilizar um organismo experimental eucarioto, possibilita a detecção simultânea de mutação gênica, aberrações cromossômicas e/ou recombinação somática (Guzmán-Rincón & Graf, 1995).

Para detecção de mutações cromossômicas os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos (Figura 1) que são testes com sistema de

validação internacional, e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* como *in vivo*, desde que se conheça adequadamente a biologia do organismo-teste. Recentemente, o teste alcalino eletroforético de célula-única ou Ensaio Cometa (Figura 2), que detecta quebras no DNA, efeitos de reparo e danos álcali-lábeis, tem sido recomendado para o biomonitoramento ambiental, por ser um teste realizado em células individuais não proliferativas, além de ser uma técnica rápida e sensível (Farbairn e cols., 1995; Tice, 1995; Silva e cols., 2000b; Tice e cols., 2000).

Mais recentemente, outras ferramentas biomarcadoras estão sendo desenvolvidas para avaliação do impacto da poluição por agentes em diferentes ambientes. Uma técnica muito sensível nesta área é a mensuração dos níveis de proteínas responsáveis por importantes funções na metabolização e detoxificação de agentes tóxicos. De forma geral, vários organismos respondem ao estresse por agentes tóxicos aumentando seus níveis de algumas proteínas de detoxificação, que podem portanto serem utilizadas como biomarcadores de exposição em diferentes ecossistemas. As proteínas de estresse são bastante conservadas e expressas em diferentes espécies, como insetos, nematodos, gastrópodos, anfíbios, répteis e mamíferos (Goering, 1995).

Dentre todas estas metodologias se destacam e foram utilizadas neste estudo o Teste de Micronúcleos e o Ensaio Cometa em sangue periférico, por serem relativamente simples e econômicos, e por tornarem possível a avaliação da genotoxicidade sem o sacrifício dos animais, possibilitando um biomonitoramento a longo prazo.

O micronúcleo é o resultado da perda de fragmento ou fragmentos de um ou mais cromossomos, podendo ser induzida por agentes que afetam o fuso mitótico. Os fragmentos ou cromossomos inteiros, que não se orientam para os núcleos filhos de uma célula em divisão, ficam perdidos no citoplasma e formam sua própria membrana nuclear, originando os micronúcleos, que são detectados em células interfásicas como pequenos corpúsculos arredondados de cromatina, separados do núcleo principal (Heddle e cols., 1983).

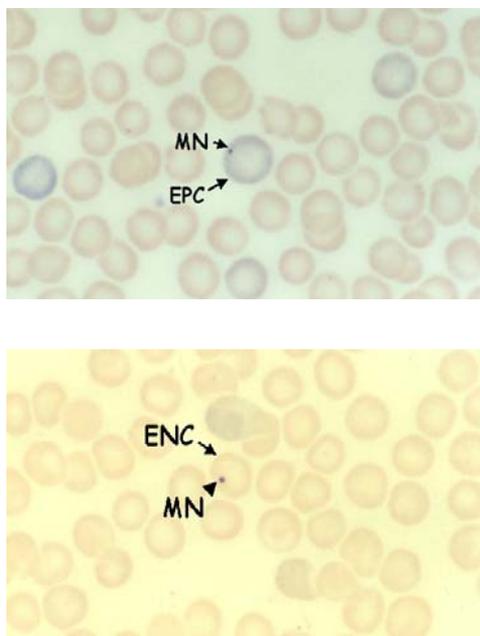


Figura 1. Esfregaços de sangue periférico: Eritrócito Policromatófilo (EPC), Eritrócito Normocromatófilo (ENC) e Micronúcleo (MN).



Figura 2. Visualização da imagem de uma célula “cometa”, onde a cabeça representa o núcleo original e a cauda os fragmentos de DNA

A técnica do Ensaio Cometa consiste em obter, a partir de células individualizadas, colocadas em agarose, lisadas, submetidas a eletroforese e coradas, uma matriz com um halo fluorescente, formado por DNA não danificado e que não migrou. Células com DNA danificado formam um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado). A extensão do DNA que migrou muitas vezes está correlacionado com o dano ocorrido (Fairbairn e cols., 1995). O Ensaio Cometa combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células e corresponde a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem a sensibilidade

na detecção de dano no DNA, a coleta de dados ao nível de célula individual, o uso de um número pequeno de células para a análise e a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas (Tice, 1995). Numerosos estudos toxicológicos foram publicados usando o Ensaio Cometa em camundongos, ratos e hamster, mas em ecotoxicologia, existem poucos estudos utilizando esta técnica em células de mamíferos (Cotelle & Férard, 1999; Silva e cols., 2000a; 2000b; 2000c).

Para as análises químicas de amostras ambientais, diferentes metodologias foram utilizadas. Quanto ao monitoramento do dióxido de nitrogênio (NO₂) e outros compostos inorgânicos presentes no ar geralmente monitores automáticos são utilizados. O problema é que tais equipamentos são muito caros e necessitam de manutenção contínua, para poder fornecer dados confiáveis. De acordo com isto, muitos países não tem condições de adquirir esses equipamentos, e ainda garantir a qualidade dos resultados. Como alternativa existem amostradores ("Palmer tubes") (Figura 3) que são muito baratos, pequenos, fáceis de manusear e ainda facilitam medidas nos mais diversos locais (Palmer e cols., 1986; Yanagisawa, 1993; Krupa & Legge, 2000).

Os amostradores "Palmer tubes" constituem-se de um tubo de acrílico, com um comprimento de 75 mm e diâmetro de 10 mm. O NO₂ é absorvido através de três telas de aço inoxidável, tratadas com trietanolamine, que são fixadas na parte interna de uma das extremidades do tubo. A outra extremidade é removida durante a exposição e no final fixada novamente. A Agência Federal Ambiental da Alemanha tem empregado esta metodologia em várias análises, sob diferentes condições climáticas e de poluição, com resultados eficientes (Moriske e cols., 1996; Moriske & Schöndube, 1998). Trabalhos de monitoramento de NO₂ com estes amostradores passivos comparados com os automáticos não demonstram variações significantes (Moriske & Schöndube, 1998).

Durante as duas últimas décadas, muitas descobertas foram feitas na determinação de elementos traço em solo e outros materiais biológicos usando técnicas nucleares. A técnica de PIXE (Produção de raios-X induzida por um Íon) (Figura 4) é usada para análise do conteúdo de metais em amostras, apresentando alta sensibilidade e simplicidade, caracterizando vários elementos ao mesmo tempo. Esta técnica se destaca por exigir uma pequena quantidade de material para análise e oferecer resultados muito rápidos e precisos (He, 1993). A amostra a ser analisada é irradiada por partículas carregadas produzidas por um acelerador. Os raios-X emitidos pela desexcitação dos átomos na amostra são analisados e sua composição é determinada. Usam-se prótons de 1 a 3 MeV para ejetar elétrons de camadas internas de átomos da amostra. Quando as resultantes vacâncias são preenchidas

espontaneamente por elétrons de camadas mais externas são emitidos os raios-X característicos. Essa técnica permite medir quantitativamente concentrações de elementos até o limite de uma parte por milhão (He, 1993).



Figura 3. Amostradores de Dióxido de Nitrogênio (NO₂), "Palme Tubes".

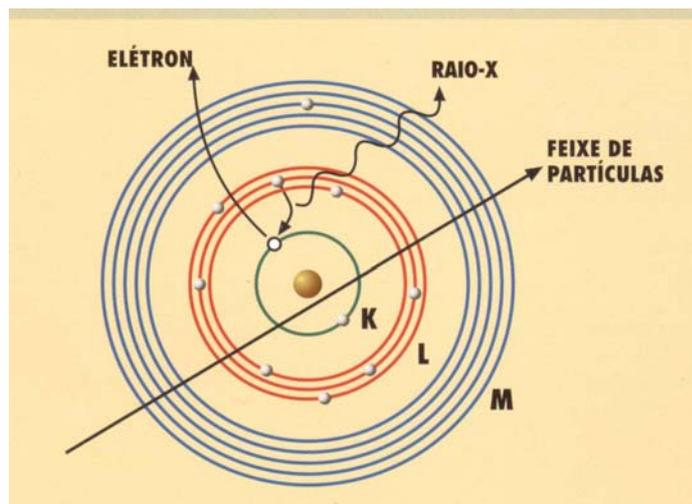


Figura 4. Esquema mostrando a produção de raios-X induzida por um íon.

Para a dosagem de hidrocarbonetos foi utilizada a técnica de APHA (1995), através de análise gravimétrica após extração com solvente hexano. Esta metodologia permite medir a concentração total de hidrocarbonetos no solo, onde ocorre a deposição dos poluentes, determinando a concentração em até 99 partes por milhão.

1.5. Organismo Bioindicador: *Ctenomys minutus*

Acredita-se que o grupo de roedores fossoriais do gênero *Ctenomys* tenha se originado no centro da Argentina, durante o Pleistoceno (Contreras e cols., 1987), sofrendo, subsequentemente, uma rápida especiação (Lessa & Cook, 1998). Atualmente este gênero é representado por 56 espécies e ocupa grande parte da América do Sul, formando populações bem delimitadas desde a Terra do Fogo até o sul da Bolívia e do Peru (Reig e cols., 1990).

O *Ctenomys minutus* (Figura 5), uma das cinco espécies de Tuco-tucos encontradas no Rio Grande do Sul (RS) e que foi analisada neste estudo, tem sua distribuição limitada aos campos arenosos, atrás da primeira linha de dunas, desde o Farol de Santa Marta, no sul de Santa Catarina, até o município de São José do Norte, no RS (Freygang e cols., 2000). Caracteriza-se por apresentar uma grande diversidade cariotípica, com doze números diplóides distribuídos em oito cariótipos, sendo eles: $2n=42$, 45, 46a, 46b, 47a, 47b, 48a, 48b, 49a, 49b, 50a e 50b (Freitas, 1995; 1997; Freygang e cols., 2000). A análise de uma zona de hibridação entre duas formas cromossômicas de *C. minutus* ($2n=46$ e 48) e um cariótipo intermediário $2n=47$, entre a Lagoa dos Barros e a Lagoa da Fortaleza (RS), realizada por Gava (1996), sugeriram uma baixa dispersão dos indivíduos, baixo fluxo gênico e altos valores de endocruzamento.

Como já citado anteriormente, outra espécie do mesmo gênero, *C. torquatus*, foi utilizada como bioindicadora no monitoramento de exposição crônica ao carvão (Silva e cols., 2000a, 2000b e 2000c). *C. minutus*, confinados a habitats fragmentados pela construção de estradas e expostos cronicamente às emissões do tráfego veicular, parecem ser um bom modelo de organismo sentinela.



Figura 5. *Ctenomys minutus*.

1.6. Caracterização do Ambiente Estudado

Em estudos de toxicologia ambiental e conservação de espécies um bom conhecimento do local de estudo e condições climáticas deste são imprescindíveis, visto a forte correlação entre estes e a heterogeneidade de níveis de poluentes no ambiente e organismos.

A planície costeira do Estado RS e norte do Uruguai, possui cerca de 37.000 km² de área, 640 km de extensão e mais de cem corpos de água que representam 39% da área total (Delaney, 1965). A planície está inserida entre a latitude 29°12' e 33°48' S e longitude de 49°30' e 53°30' W (Schwarzbold & Schafer, 1984). Geograficamente, considerando-se o relevo do Estado, situa-se entre as terras altas do território, a oeste, e o Oceano Atlântico a leste. As altitudes na área de restinga não ultrapassa 6 m, exceto para algumas dunas (Waechter, 1985).

Segundo Villwock (1984), a planície costeira consiste de um conjunto de fácies sedimentares descontínuadas no tempo e no espaço, resultantes do acúmulo de sedimentos

originados por transgressões e regressões sucessivas do nível do mar com início no período Pleistocênico. Toda essa dinâmica da formação da planície costeira deve ter influenciado as populações de *C. minutus* fazendo com que apresentassem a sua distribuição geográfica atual (Freitas, 1995).

O clima da região é do tipo subtropical úmido na classificação de Koppen, o que assegura uma distribuição de chuvas durante o ano inteiro, fator importante para o regime de águas com verão quente e inverno frio. Por estar localizado na zona subtropical sul na costa oriental da América do Sul, o clima da região é controlado por massas de origem tropical marítima e polar marítima (Strahler, 1977).

A temperatura média anual situa-se em torno de 20°C, com umidades relativas do ar entre 76 e 86%. A precipitação média na área situa-se entre 1504 mm e 1323mm, valores obtidos nas estações em Osório e Imbé, respectivamente (Hasenack & Ferraro, 1989).

A direção predominante do vento é nordeste, sendo a velocidade média anual de 5,4 m/s em Osório e 6,9 m/s em Imbé. No verão predomina o vento do quadrante nordeste e no inverno o noroeste (Hasenack & Ferraro, 1989).

As áreas de estudo situa-se na parte norte da planície costeira, onde se encontra o sistema lagunar da região Tramandaí-Osório. Localizam-se à beira da estrada RS/030, próxima ao município de Osório e é uma via de acesso à BR 101, estrada que une o RS ao resto do Brasil margeando a costa. O tráfego de veículos nesta estrada é constante nos meses de março a outubro, aumentando consideravelmente no período do verão.

2. OBJETIVOS

Em função do que se conhece sobre a poluição causada pelas emissões de automóveis, visando avaliar os possíveis efeitos danosos destes na natureza, e ainda possibilitar a prevenção e o monitoramento de possíveis riscos que os organismos possam estar sofrendo, é que se teve como objetivos neste trabalho:

1. Avaliar o possível efeito da exposição às emissões veiculares através do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos, comparando os resultados obtidos por ambos os testes, utilizando como bioindicador o roedor *Ctenomys minutus*;

2. Verificar possíveis correlações dos efeitos danosos ao DNA induzidos pelas emissões de veículos com fatores que poderiam influenciar os resultados de genotoxicidade, como:

- (a) estação do ano (sazonalidade);
- (b) idade e sexo dos indivíduos;
- (c) fluxo de veículos durante os períodos das avaliações;
- (d) dados meteorológicos: temperatura e direção dos ventos;

3. Correlacionar na medida do possível os resultados das análises de genotoxicidade com os agentes ambientais associados à poluição causada por veículos, como:

- (a) hidrocarbonetos no solo;
- (b) metais pesados (elementos-traço) no solo;
- (c) dióxido de nitrogênio.

3. GENOTOXICITY BIOMONITORING IN REGIONS EXPOSED TO
MOTOR VEHICLE EMISSIONS USING NATIVE RODENT *Ctenomys*
minutus BY COMET ASSAY AND MICRONUCLEUS TEST

A ser enviado para a revista Environmental and Molecular Mutagenesis

**Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using Native Rodent
Ctenomys minutus by Comet Assay and Micronucleus Test**

Short Running Title: Biomonitoring of Regions Exposed to Automobiles Exhaust

Vanina D. Heuser ^{a,*}, Juliana da Silva ^a, Heinz-Jörn Moriske ^b, Johnny F. Dias ^c, Maria Lúcia Yoneama^d, Thales R. O. de Freitas ^a

^a Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil.

^b Federal Environmental Agency, Department for Water, Soil and Air Hygiene, Berlin, Germany.

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

^d Programa de Pós-Graduação em Geologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo-RS, Brazil.

*Correspondence to: Vanina Heuser, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, CP 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: vaninaheuser@hotmail.com

Contract grant sponsor: CNPq; FAPERGS; GENOTOX; Projeto Tuco-tuco

ABSTRACT

The exposure to motor vehicle emissions represents an important cause of concern for its possible long-term effects on organism's health. The present report is concerned with: 1) the application and verification of alkaline Comet assay (SCG) to *Ctenomys minutus* (a fossorial rodent) to detect the possible genotoxicity effects due to automobile emissions; 2) compare the results with a Micronucleus (MN) assay, both in peripheral blood; 3) the identification of some agents involved and seasonal variations effects. Automobile exhaust exposed *C. minutus* (Octodontidae-Rodentia), were captured at two different fields from both sides of RS/030, a highway in the coastal plain of the Brazilian state of Rio Grande do Sul: Amaral and Weber. Reference animals were obtained from Maribo field, a region about 3 km distant from an other highway (RS/389). By the end of this study, 123 rodents (73 females and 50 males) had been live-trapped. Our results for *C. minutus* permanently exposed to automobile emissions did not demonstrate an increase in micronucleated cells, but did show an increase in cells with levels of DNA damage. Alkaline SCG showed more sensitivity, demonstrating study areas and seasonal/temperature differences, besides relationship to aging and gender. The negative evaluation for the induction of MN in peripheral blood erythrocytes demonstrated, although alkaline SCG results showed the adults females as the principal group affected by air pollutants from vehicle emissions, this kind of damage may be quickly repaired. This study provided chemical and biological data from areas exposed to automobile exhaust, suggesting the association among hydrocarbons, metals and NO₂ with levels of damaged cells observed in the wild rodent *C. minutus*.

Key words: Automobile exhaust, Comet assay, *Ctenomys minutus*, Environmental monitoring, Genotoxicity, Micronucleus assay

INTRODUCTION

There is an ever-increasing number of chemicals present in our environment, many of which are capable of inducing adverse health effects as in native organisms as in the humans. The exposure to motor vehicle emissions represents an important cause of concern for its possible long-term effects on organisms' health. A number of experimental studies, as well as epidemiological evidence, indicate that gasoline and diesel engine exhausts are mutagenic and carcinogenic to laboratory animals and possibly to humans [IARC, 1989]. Due to the growing impact of vehicle emissions on human health, especially in urban densely populated areas, the development of control measures to limit human exposure to motor vehicle pollutants is urgently required [Crebelli, 1995].

The ecological impact and risks to organisms' health associated with exposure to environmental pollutants are exceedingly difficult to evaluate because many of the mutagens are components of complex mixtures [DeMarini, 1998]. The emissions resulting from the internal combustion of automobile engines consist of thousands of separate hazardous compounds [Huisingh, 1980]. The most commonly mentioned hazardous substances are nitrogen oxides (NO_x), carbon monoxide (CO), sulfur dioxide (SO₂), hydrocarbons (HC) and their derivatives, and inorganic compounds [CETESB, 1992; Pierce et al., 1998], including metals (cadmium, chromium, copper, nickel, vanadium, zinc and lead) [Freedman, 1995]. These emission products also present cytotoxic and genotoxic proprieties [Hadnagy et al., 1988; Rojas et al., 1999].

Potentially harmful exposure situations are generally identified by analytical techniques or by epidemiological investigations. Another approach for evaluating the possible consequences of pollution involves the assessment of genotoxic damage, cytotoxic damage, and other detrimental effects in sentinel organisms [Tice, 1995; Cotelle and Férard, 1999; Silva et al., 2000a]. The alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCG) assay or Comet assay is a rapid, simple and sensitive technique for measuring and analyzing DNA breakage in individual cells [Singh et al., 1988; Fairbairn et al., 1995; Silva et al., 2000b; Tice et al., 2000]. In principle, any organism is suitable for investigation and only very small cell samples are need. As a result, the SCG assay is becoming a major tool for

environmental biomonitoring. The sensitivity of the Comet assay may be compared with the sensitivity of the well-established Micronucleus test, which also detects DNA strand breakage although both methods measure different endpoints. The Micronucleus test measures a small subset of unrepaired DNA strand breaks, whereas the alkaline Comet assay measures strand breaks that happen before the DNA repair system [Cotelle and Férard, 1999]. The protocol that uses endemic rodents (*Ctenomys torquatus*) to assess the biological hazards of polluted sites was developed using the Comet assay to permit genotoxicity monitoring without removing them from their habitat and without sacrificing them [da Silva et al., 2000a].

The present report deals with the use of alkaline SCG to *Ctenomys minutus* (a fossorial rodent) to detect the possible genotoxicity effects to automobile emissions and to compare the results with a Micronucleus (MN) assay, both in peripheral blood, and additionally to identify some agents involved and seasonal variation effects influence.

MATERIALS AND METHODS

Animal Sampling

Automobile exhaust exposed *C. minutus* (Octodontidae-Rodentia) were captured at two different fields from both sides of RS/030, a highway in the coastal plain of the Brazilian state of Rio Grande do Sul: (a) Amaral (S29°57'14.5" W50°14'12.6"); and (b) Weber (S29°57'35.1" W 50°13'48.3"). Reference animals, the external control, were obtained from Maribo field (S29°51'35.4" W 50°10'41.2"), a region about 3 km distant from a highway (RS/389), consequently far from vehicle emissions (Fig. 1).

The monitoring of natural populations of rodents for genetic damage study began in May 2000 and continued until June 2001, with one trapping per season per site. Oneida Victor (number zero) traps with a rubber cover for fossorial rodents were set where fresh earth mounds were located. Animals received anesthesia (Zoletil/Virbac, Carros Cedex, France) for blood collection and morphological measurements, and were released at the place of capture after recovery. Peripheral blood was obtained from foot pricks, with the help of capillaries. The rodents were marked with numeric tattoos on the hind legs, enabling the identification of animals in subsequent captures. By the end of this study time, 123 rodents (73 females and 50 males) had been live-trapped. The *C. minutus* age groups were determined according to the Wilks [1963] method. All work with the animals in this study was done with the permission of IBAMA (the official Brazilian environmental protection agency).

Micronucleus Assay

The MN assay for peripheral blood was selected as the second monitoring system for comparison with alkaline SCG sensitivity. This assay was performed according to guidelines and recommendations [Miller et al., 1997; Hayashi et al., 2000]. Whole blood smears were prepared on

microscope slides, air dried and stained with a mix of 60 ml Giemsa, 30 ml May Grünwald Giemsa, and 10 ml phosphate buffer (pH 5.8) for 5 min.

Subsequently, the slides were rinsed with phosphate buffer and air-dried. Four blood smears were prepared from each animal. The slides were coded for “blind” analysis. The frequency of micronucleated cells was analyzed in 2,000 polychromatic erythrocytes (PCE) and 4,000 normochromatic erythrocytes (NCE) per animal. The percentage of micronucleated cells by gender, age groups and sites, observed among 1,000 cells (%) analyzed, was calculated. The Bartlett-Box test was used to evaluate the variances' homogeneity for each site group. The statistical significance of the mean percentage of PCE and NCE with MN was determined using the Student's t-test. A difference of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Comet Assay

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh et al. [1988], with further adaptations by da Silva et al. [2000a] for field work.

Together with the blood samples from *C. minutus*, human blood was also collected on the same day and under the same conditions. Human peripheral blood was obtained from finger pricks, with the help of capillaries. These sampler were taken as an internal control for damages caused by manipulations, delay, or transport of blood to the laboratory.

Blood cells (6 μ l) were embedded in 95 μ l of 0.75% low melting point agarose. The mixture (cell/agarose) was added to a fully frosted microscope slide coated with a layer of 300 μ l of normal melting agarose (1%). After solidification, the slides were placed in lysis buffer (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris, pH 10.0-10.5, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulphoxide [DMSO]) for a minimum of 1 hour and a maximum of two weeks. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH 12.6) for 30 min. The DNA was electrophoresed for 30 min at 25 volts (0.90 V/cm) and 300 mA, and then the alkali

was neutralized with 0.4M Tris (pH7.5). Finally, the DNA was stained with ethidium bromide (2 μ g/ml).

To demonstrate the electrophoresis conditions and efficiency, negative and positive controls from human blood collected in the laboratory were used for each electrophoresis treatment. For a positive control, 50 μ l of whole blood was mixed with 13 μ l of methyl methanesulfonate (MMS-M4016/Sigma, St. Louis, MO) at 8×10^{-5} M. This mix was incubated for 2 hours at 37°C. The result of each electrophoresis was considered only if the negative and positive controls yielded negative and positive results respectively.

Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Comet image lengths (nuclear region+tail) were measured in arbitrary units, with a calibrated scale in the ocular, using a fluorescence microscope equipped with an excitation filter of BP546/12 nm and a barrier filter of 590 nm. One unit was approximately 5 μ m at 200X magnification.

Cells were also scored visually according to tail size into five classes, from undamaged (0), to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score to each animal, and consequently to each studied group. Therefore, the group's damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage, 100 cells x 4) [Collins et al., 1995; 1997].

The Bartlett-Box test was used to evaluate the variances' homogeneity of each site group. Pearson correlation and linear regression line were carried out to compare DI and environmental temperature. Mean temperatures for each season were obtained by averaging temperatures per site around the capture date from the previous week. Temperature data were provided by the Meteorology Institute (8° Distrito de Meteorologia-DISME / Ministério da Agricultura). The Damage Frequency (%), was calculated based on number of cells with tail vs. those without. The statistical evaluation was performed using the two-tailed Student's t-test. A difference of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Chemical Analysis

The total hydrocarbon concentration in soil was performed by the Ecology Center, of the Federal University of Rio Grande do Sul. The soil was obtained from *C. minutus* burrows, one sample per season. The samples were mixed and dried at 60° C during 24h, resulting in a single sample from each place. The total hydrocarbon concentrations in the soil were measured using 200g from each sample, using gas chromatography [APHA, 1995].

The same mixed samples were used to verify the presence of metals related to vehicle emissions. The PIXE (Particle-Induced X-ray Emission) technique was used to analyze the metal content in the samples due to its high sensitivity, simplicity and true multielemental feature. All soil samples were ground into a fine powder and mixed with a binder (carnaúba wax, Type III, Orion) in the proportion of one part of binder to 5 parts of soil. The mixtures were homogenized and pressed into pellets of about 3mm thick. These pellets were fixed in a target holder inside a reaction chamber with a pressure of about 10^{-5} mbar. The PIXE experiments were carried out at the Ion Implantation Laboratory of the Physics Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul. A 3.0 MeV Tandatron accelerator produced a proton beam of 2.0 MeV with an average current of 10 mA at the target. For each sample, the integrated charge to 16 μ C. The X-rays were detected by a high purity germanium (HPGe) detector with an energy resolution of 170 e V at 5.9 keV. The data acquisition system was optimized to allow X-rays energies up to 20 keV. The spectra were analyzed with the GUPIX code [Campbell et al., 2000] developed at the University of Guelph (Canada).

Two Palmes Tubes passive samplers were placed at each side of the road RS/030 (limit between Amaral field and the road, and Weber field and the road) at each season, during the capture previous week before the capture, in order to measure the concentrations of nitrogen dioxide (NO₂) in the air [Palmes et al., 1986]. Other two samplers were placed at the Maribo field (3 km far from the road), in order to provide a comparison. The exposure time was one week (168 h) for each sampler. Double samples at the same place were taken to minimize the deviation of the sampling rates. The sampler made of acrylic tube has three stainless steel screens that absorbed the NO₂ and are coated with triethanolamine (TEA). After exposure, a special combination reagent (that reacts with the NO₂)

is added and gives a colour change of the whole solution. Photometric detection is made at a wavelength of 535 nm [Moriske et al., 1996; Moriske and Schoendube, 1998; Krupa and Legge, 2000]. The Palmes samplers were provided and analyzed by the Umweltbundesamt (UBA), Berlin, Germany.

RESULTS

The MN data for *C. minutus* that were captured between winter 2000 and autumn 2001 are summarized in Table I, II and III. No significant difference between gender and age groups by site were observed. Two age groups for *C. minutus* were determined by weight: (I) subadults, females up to 170 g and males up to 233 g; and (II) adults, above the limits found in subadults. Geographic position accounted for very little variability, with no significant differences between seasons. The Bartlett's test indicated that the variances were essentially equal.

Table III also presents the mean percentage (%) of mPCE and mNCE for each season per site group. Comparisons for each season and test group by Student's t-test against Maribo field, the external control, showed very small variations. Thus, no seasonal pattern could be distinguished.

The Comet assay was performed from the same blood samples used to make smears for the MN assay.

Data on the mean DNA image length, damage index (DI) and damage frequency of *C. minutus* from Maribo, Weber and Amaral for each season and annual average are presented in Table IV. The DI ($P < 0.01$) and damage frequency ($P < 0.001$) of Amaral are significantly higher than Maribo only for winter season, although Amaral data showed larger values for each season than Maribo. Weber field also demonstrated a significant difference only for winter/2000, DI ($P < 0.05$) and damage frequency ($P < 0.001$). The DNA image length for Amaral and Weber field was not significantly different from Maribo field, for all seasons. None of blood samples from internal control showed a positive response. The analysis of the annual average using the Student's *t*-test indicated a significant increase in DI ($P < 0.001$) and damage frequency ($P < 0.001$) for Amaral and in damage frequency ($P < 0.01$) for Weber compared to Maribo group. Negative (DI= 0-3) and positive controls (DI= 300-400) for electrophoresis demonstrated negative and positive results, respectively. The Bartlett's test indicated homogeneity of variances of each site group.

Table IV also shows the mean temperature ($^{\circ}\text{C}$), mean NO_2 and mean traffic (per day) during the week preceding the date of each capture per site. NO_2 measured from sites for each season showed that Maribo had a lower pollution than Weber and Amaral. At both test sites, Weber and Amaral, the annual average of NO_2 concentration was significantly different ($P < 0.001$) compared to Maribo, but similar average NO_2 concentration and traffic situation for the Weber and Amaral fields.

The correlation and regression coefficient between DNA damage and temperature, using one-way analysis of variance, was used to compare damage and temperature per site. The correlation coefficients for Maribo ($r = -0.07$), Weber ($r = -0.42$) and Amaral ($r = -0.60$) showed no significant correlation after t-test. The linear regression analysis from each site demonstrated a trend linking lower temperatures to more damaged cells (Fig. 2). The regression coefficients were also tested by t, but no significance was detected.

Table V shows that only females from Amaral field presented a DI significantly higher than females from the control, Maribo. No significant difference between gender for each group was observed, although females showed higher sensitivity than males for pollutants. Females and males were placed in a single group (Table VI), separated by age and site groups. Table VI shows that subadults have a higher DNA damage than adults, for each capture site. Subadults from Maribo and Weber showed a DI significantly higher than adults from the same groups (Maribo $P < 0.01$ and Weber $P < 0.05$). The damage frequency for Maribo subadults and adults also demonstrated significant difference ($P < 0.01$). When Weber and Amaral subadults were compared with Maribo, there is no significant difference in DNA image length, DI and damage frequency. On other hand, adults from Amaral field presented a DI significantly higher ($P < 0.001$) than adults from the control Maribo group.

Thus, considering that between females and males and between subadults and adults were observed differences in DNA damage, the genders were divided in two groups: by age and site (Fig. 3a and b). Figure 3a shows that although female subadults presented a higher DI than female adults, DI showed significant difference only when female adults from the three sites groups were compared

(Amaral > Weber > Maribo). No significant difference was observed for males subadults and adults, although males subadults presented also a higher DI than male adults (Fig. 3b).

The results obtained about presence of metals in soil are summarized in Figure 4, showing some of the elements observed in the PIXE spectra for all samples under study. Due to the somewhat high count rates, some pile-up [Knoll et al., 1989] peaks were present in the spectra as well.

The results demonstrated that most of the metals related to automobile pollution were present at higher concentration levels on those samples collected on both sides of road (Weber > Amaral) when compared with sample from the external control (Maribo): chromium (Cr) - 3 to 6 times, copper (Cu) - 1 to 2 times, nickel (Ni) - 5 to 7 times, and zinc (Zn) - about 4 times (Table VII).

Concerning hydrocarbons, soil sample from Amaral field (5500 ppm) showed higher total concentration than Weber field (4500 ppm) and Maribo field (4000 ppm) (Amaral > Weber > Maribo).

DISCUSSION

The many vehicle and fuel changes in the last 25 years have greatly reduced toxic emissions from highway vehicles. Indeed, new automobiles today are capable of emitting up to 90% less air toxic gases than the uncontrolled models of 1970. Moreover, new trucks and buses are designed to release less than half the toxic gases of their 1970 counterparts. However, the number of vehicles on the road and the number of miles they travel is continuing to grow [EPA, 1994].

Numerous assays have been developed to monitor biological hazards caused by pollutants, but few genotoxicity studies have been conducted to evaluate the mutagenic potential associated with the exposure of mammalian systems [Baker et al., 1996; Cotelle e Ferrard, 1999; Silva et al., 2000b], and to evaluate the chronic impact of contaminants on organisms [Belpaeme et al., 1998]. Although *C. minutus* are fossorial rodents, they normally come up to the surface to feed and clean their burrows. They are herbivorous animals and dig their burrows with the help of paw and tooth. Thus, they expose themselves to the contaminants in the soil and plants, and expose their microenvironment to the atmosphere in the region, with or without pollutants. In the present study, the usefulness of the Comet and Micronucleus assay in blood samples to evaluate chronic exposure to motor vehicle emission was tested on *C. minutus*.

Hazard caused by pollutants resulting from engine exhausts and fuel components have been described by many authors using *Salmonella typhimurium* [Crebelli et al., 1995; Edenharder et al., 2000; Wesp et al., 2000], sentinel species [Ahmed et al., 1998] and gasoline station attendants [Carere et al., 1998; Santos-Mello & Cavalcante, 1992; Gattás et al., 2001; Hogsted, 1991]. Different techniques have been utilized to verify genotoxic and citotoxic effects, such as chromosomal abnormalities [Carere et al., 1998; Wesp et al., 2000], deletions [Santos-Mello & Cavalcante, 1992], micronucleus [Hogsted et al., 1991; Gattás et al., 2001], and sister-chromatid exchange [Ahmed et al., 1998]. Most of these studies observed a small increase in damage for exposed organisms to exhaust emissions. Our results for *C. minutus* environmentally exposed to automobile emissions demonstrated

no increase in micronucleated cells (Tables I, II and III), but an increase in cells with levels of DNA damage (Tables IV, V, VI and Fig. 2 and 3). The alkaline Comet assay showed more sensitivity, resulting in clearer differences among the evaluated groups, including study area, gender and age groups.

The results from the MN and Comet assays show an obvious difference in sensitivity, which becomes clearer when Tables III and IV are evaluated. For MN assay, variations in micronucleated cells frequency were not observed, thus no seasonal pattern was demonstrated. For the alkaline SCG, little seasonal variations were observed, demonstrating the higher sensitivity of this test. These differences between tests can be explained by the biological mechanism where the spleen captures and destroys circulating micronucleated erythrocytes in some organisms (e.g. rats) [Schegel and McGregor, 1984]. Thus, the peripheral blood MN assay is considered less suited than many others tests. Nevertheless this assay is well accepted [CSGMT, 1992; Holden et al., 1997; Hayashi et al., 2001], mainly when the sacrifice of the animals is not recommended. The possibility of spleen capture and destruction of micronucleated erythrocytes in *C. minutus* can be reinforced by the significantly reduction of micronucleated NCE in relation to the in PCE, indicating the micronucleated cells do not remain in the circulation.

Table IV shows significantly higher damage values for the winter of 2000 than for the remaining seasons at the three sites. Many studies also reported seasonal variation of mutagenicity with a maximum during winter in different countries [Barale et al., 1989; Srám et al., 1996; Budzinski et al., 1997; Edenharder et al., 2000; Silva et al., 2000b]; in some of them vehicular traffic was identified as the only possible source of airborne mutagens. The regression analysis (Fig. 2) concurred with earlier findings, which demonstrated an inverse ratio between temperature and damage, although a significant correlation was not demonstrated. However, the mean traffic during the summer was higher than in the winter (Table IV), that deals to more emissions during this season. Moreover, considering that airborne mutagens from emissions are soil mutagens, and that our results demonstrated more DNA damage in the winter, these compounds are possibly modified by microorganisms and microflora of soil [Edenharder et al., 2000]. *C. minutus* (fossorial) are in direct

contact with soil due to its habitat. Thus if less rapid photochemical inactivation and reduced volatilization of airborne mutagens occur during the winter as well as an increase on deposition rates of vapor-phase mutagens on to particulate matter in air in both dry and wet transport to surface [Edenharder et al., 2000], it can explain the relation between less emissions, lower temperatures and more damaged cells.

NO₂ levels associated with vehicle exhausts were similar in both Weber and Amaral during all seasons. Maribo did not show the same association (NO₂ to traffic), obviously on account to its distance from the highway. Weather patterns determine how air contaminants are disperse and how they move through the troposphere. [Peirce et al., 1998]. The predominant force in pollution transport is the wind and the tendency for pollutants is to go downwind. Hasenack and Ferraro [1989] observed that the predominant wind for the regions of this study is northwest during the winter and northeast in the summer. Thus, when geographic localization of the highway RS/030 (Fig. 1) is observed, the results of the NO₂ data (Table IV), accord with the wind direction, in the winter Weber showed larger values than Amaral, and in the summer the opposite occurs. Despite of the NO₂ annual average measured in Amaral showed less NO₂, higher DI and higher damage frequency than Weber. Although there was no significant difference between Amaral and Weber for NO₂, it was observed that the wind during the year was generally northwestern direction, thus turning the Amaral region downwind (directly exposed to emissions) and Weber, upwind. Krupa and Legge [2000] and Moriske et al. [1996] discuss some passive samplers limitations, where the effects of wind velocity, radiation, temperature and relative humidity must be addressed in the context of adsorbent/adsorbent performance and sampling rate. Thus, passive samplers may provide under- or overestimations of the cumulative exposure [Moriske et al., 1996; Krupa and Legge, 2000]. Adding strong support to the hypothesis that Amaral field is more exposed to emissions, due to the predominant wind, is the observation that the soil sample from this field presented a higher total concentration of hydrocarbons (2416 ppm) than both Weber (183 ppm) and Maribo (1000 ppm). The higher concentration in Maribo rather than Weber can be explained due to not all hydrocarbons being the result of human activity. There is some evidence that hydrocarbons may also be formed by direct biosynthesis by microbes and

plants [Yu, 2001], but the most common hydrocarbons emitted by this way are isoprene and various terpenoids [Freedman, 1995]. Once the photochemical reactions involving NO_x and O₃ responsible for the transformation in some toxic hydrocarbons, Maribo (control) shows less DNA damage than Weber.

Metal concentrations of metals from Weber and Amaral (Weber > Amaral) showed higher levels than the control (Fig. 4), although it did not demonstrate similar distribution in the fields as hydrocarbons (Amaral > Weber). This difference can be explained due to hydrocarbons that are transported through the atmosphere in the vapor phase and/or adsorbed on particulate matter, which also occur with metals, although its distribution in the soil, vegetation, and in the atmosphere is mainly along the highways [Freedman, 1995]. Cr, Cu, Ni and Zn, the principal metals observed in soil samples from Weber and Amaral were above Maribo levels (Table VII). Cu and Zn are not mutagens in most of the traditional mammalian test systems, and nickel is considered a weak mutagen; and Cr, about these observed metals, is the only one with strong mutagenic effects [Rojas et al., 1999]. The same authors suggest that metals induce DNA damage by the production of DNA single strand breaks, which are soon repaired.

Adults and subadults (Table II and VI) were compared to demonstrate a possible relationship between age and damage. No significant difference between adults and subadults by MN assay was demonstrated. But the subadults from the control study area (Maribo) presented twofold increase in the number of cells with DNA damage than adults (Comet assay / Table VI). This observation is not evident for Weber and Amaral groups due to both fields being exposed to pollutants. Zúñiga-González et al. [2001a; 2001b] showed similar findings for many species, where young animals presented higher spontaneous damage values than adults. In contrast, Silva et al. [2000b] did not demonstrate difference between subadults and adults of *C. torquatus* for spontaneous DNA damage. Although different results for the same genera (*Ctenomys*) were found, age-specific differences in metabolism are observed in certain strains of rodents [Mugford and Kedderis, 1998].

About males and females (Table I and V), at both MN and comet assays, DNA damage measured were statistically similar, and no significant gender difference was observed. Table V and VI

(Comet Assay) also demonstrated significant increase of DNA damage for females and adults, compared with males and subadults, respectively. Again, figure 3 showed that only female adults from regions exposed to automobile exhaust presented significant response to pollutants. Thus, females showed higher rates of xenobiotic metabolism than males, which is more common due to female sex hormones [Mugford and Kedderis, 1998]. The same authors comment that sex-specific differences can produce a lower clearance of the chemical in the sex with the slower rate of metabolism, resulting in a prolonged half-life and higher blood concentration of the compound, which may cause toxicity. Conversely, if a toxic metabolite is produced by metabolism, the sex with the lower metabolic activity is less susceptible to the specific chemical-induced toxicity. In addition, these sex-dependent variation in metabolism by rodents may be the result of differential evolution of isoforms of cytochromes P450 in mammals.

Regarding adults exposed to emissions presented significant increase of damaged cells, similar increases in the level associated with age were found for whales exposed to PHAs, with the adults showing a significant increase of cytochrome P450 expression as compared with juveniles [Moore et al., 1998].

Some of the difficulties that faced biomonitoring have been to identify the individual compounds that may be responsible for possible adverse effects associated with exposure to environmental agents, besides difference between species and metabolism [Talmage and Walton, 1991]. Samples obtained from environmental sources are complex mixtures of organic and inorganic compounds, consisting of thousands of individual components, which may interact to produce additive, potentiation, synergistic, or antagonistic effect. This study provided chemical and biological data from areas exposed to automobile exhaust, indicating the association among hydrocarbons, metals and NO₂ with levels of damaged cells observed in the wild rodent *C. minutus*.

In conclusion, our results agree with previous data on engine exhausts and fuel components, mainly PAHs, where it was generally observed weak increase in damage for exposed native rodent to automobile emissions. Alkaline SCG showed more sensitivity, demonstrating seasonal/temperature differences and relationship to aging and gender. The evaluation for the induction of MN in peripheral

blood erythrocytes, which measure unrepaired DNA damage, demonstrated that although alkaline SCG results showed that adults females are the principal affected by air pollutants from vehicle emissions, the damage observed may be quickly repaired.

Finally, we believe that the *in vivo* genotoxicity of automobile exhausts can be biomonitored by the alkaline SCG. However, more studies are necessary to result in a better understanding about xenobiotic metabolism of *C. minutus* and how the specific factors affect the outcome of the emission exposure.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Bernardo Erdtmann, Åsa Dahlström Heuser and John Steve Carpenter for their invaluable comments and suggestions for this study. We are also grateful to M.B. Fonseca and C. Ferreira for their help during the field work. Furthermore, we wish to thank Marcelo Borsato (Fazenda Maribo), Belmiro Weber, and Zeferino Amaral, for the possibility to perform field work in their properties.

References

- Ahmed A, Mahrous K, El-Sobhy H. 1998. Cytogenetic study of buffalo under pollution of environmental conditions. *Mutat Res* 419: 21-26.
- Alexander RR, Alexander MA. 1999. Genotoxicity of two polycyclic aromatic hydrocarbons declines as they age in soil. *Environ Toxicol Chem* 6: 1140-1143.
- APHA - American Public Health Association. 1995. Standard methods for examination of Water and wastewater. No 16. Washington: 1268 p.
- Baker RJ, Hamilton MJ, Bussche RAVD, Wiggins LE, Sugg DW, Smith MH, Lomakin MD, Gaschak SP, Bundova EG, Rudenskaya GA, Chesser RJ. 1996. Small mammals from the most radioactive sites near the chornobyl nuclear power plant. *J Mammal* 77: 155-170.
- Barale R, Zucconi D, Giorgelli F, Carducci AL, Tonelli M, Loprieno N. 1989. Mutagenicity of airborne particles from a nonindustrial town in Italy. *Environ Mol Mutagen* 13: 227-233.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. 1998. Development and validation of the in vivo alkaline Comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res* 415: 167-184.
- Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Piérard C, Garrigues P. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chem* 58: 85-97.
- Bünger J, Müller MM, Krahl J, Baum K, Weigel A, Hallier E, Schulz TG. 2000. Mutagenicity of diesel particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis* 15: 391-397.
- Campbell JL, Hopman TL, Maxwell JÁ, Nejedly Z. 2000. The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database. *Nucl Instrum Meth B* 170: 193-204.
- Carere A, Antocia A, Cimini D, Crebelli R, Degrassi F, Leopardi P, Marcon F, Sgura A, Tanzarella C, Zijno A. 1998. Genetic effects of petroleum fuels: II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. *Environ Mol Mutagen* 32: 130-138.
- CETESB. 1992. Relatório de Qualidade do ar no Estado de São Paulo (In Portuguese).

- Collins A, Ai-guo M, Duthie SJ. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336: 69-77.
- Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: Reability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 30:139-146.
- CSGMT - The Collaborative Study Group for the Micronucleus test. 1992. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS - MMS. *Mutat Res* 278: 83-98.
- Cotelle S, Féraud JF. 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environ Mol Mutagen* 34: 246-255.
- Crebelli R, Conti L, Crochi B, Carere A, Bertoldi C, Giacomo ND. 1995. The effect of fuel composition on the mutagenicity of diesel engine exhaust. *Mutat Res* 346: 167-172.
- De Marini DM. 1998. Mutation spectra of complex mixtures. *Mutat Res* 411: 11-18.
- Edenharder R, Ortseifen M, Koch M, Wesp HF. 2000. Soil mutagens are airborne mutagens: variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutat Res* 472: 23-36.
- EPA - Environmental Protection Agency. 1994. Air toxic from motor vehicles. August. Online: <http://www.cnie.org>
- Farbairn DW, Olive PL, O'Neil I KL. 1995. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59.
- Freedman B. 1995. Toxic elements. In: Freedman B, editor. *Enviromental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance and Other Stresses*. Canada: Dalhousie University, p 62-93.
- Gattás GJF, Cardos LDA, Medrado-Faria MDA, Saldanha PH. 2001. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occup Med-Oxford* 51: 107-113.
- Hadnagy W, Seemayer NH. 1988. Cytotoxic and Genotoxic effects of extract of particulate emission from a gasoline-powered engine. *Environ Mol Mutagen* 12: 385-396.

- Hasenack H, Ferraro WL. 1989. Considerações sobre o clima da região de Tramandaí, RS. In: UFRGS editor. Pesquisas/ Instituto de Geociências. Porto Alegre: UFRGS, p 53-70.
- Hayashi M, Macgregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutou, S. 2000. *In vivo* rodent erythrocyte Micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen* 35: 234-252.
- Hogsted B. 1991. Gasoline pump mechanics had increases frequencies and sizes of micronuclei in lymphocytes stimulated by pokeweed mitogen. *Mutat Res* 263: 51-55.
- Holden HE, Majeska JB, Studwell D. 1997. A direct comparison of mouse and rat bone marrow and blood as target tissues in the Micronucleus assay. *Mutat Res* 391: 87-89.
- Huisingh JL. 1980. Short-term carcinogenesis and mutagenesis bioassays of mobile-source emissions. In: Waters MD, Sandhu SS, Husingh JL, Claxton L, editors. *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures II*. New York: Plenum, p 269-275.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. 1989. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. In: *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans*. Lyon, 46.
- Knoll, GF. 1989. *Radiation Detection and Measurement*, 2th edition. New York: John Wiley & Sons.
- Krupa SV, Legge AH. 2000. Passive sampling of ambient, gaseous air pollutants: an assessment from an ecological perspective. *Environ Pollut* 107: 31-45.
- Miller B, Pötter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. 1997. Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* Micronucleus test. *Mutat Res* 410: 81-116.
- Missini S, Lombi E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia fava* micronucleus test, of Tiber river sediments, *Mutat Res* 393: 17-21.
- Moore MJ, Miller CA, Weisbrod AV, Shea D, Hamilton PK, Kraus SD, Rowntree VJ, Patenaude N, Stegeman JJ. 1998. Cytochrome P450 1A and chemical contaminants in dermal biopsies of

- northern and southern right whales. Special Meeting of International Scientific Commission of Whale M98/RW24: 1-13.
- Moriske H-J, Schöndube M; Menk G; Seifert B. 1996. Erfassung von NO₂-Konzentrationen in der Außenluft mittels Passivsammlern nach Palmes. 1. Mitteilung: Laborversuche und Qualitätssicherung. Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft 56: 129-132.
- Moriske H-J, Schöndube M. 1998. Use of passive samplers for measuring nitrogen dioxide in developing and developed countries. Proceedings. 11th World Clean Air and Environment Congress, Durban Chapter 7B-4.
- Mugford CA, Kedderis GL. 1998. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. Drug Metab Ver 30: 441-498.
- Palmes ED, Burton Jr RM, Ravishankar K, Solomon J J. 1986. A simple mathematical model for diffusional sampler operation. Am Ind Hyg Assoc J 47: 418-420.
- Peirce JJ, Weiner RF, Vesilind PA. 1998. Meteorology and Air Pollution. In: Environmental Pollution and Control. 4th edition, p. 125-135.
- Petras M, Vrzoc M, Pandrangi R, Ralph S, Perry K. 1995. Biological monitoring of environmental genotoxicity in southwestern Ontario. In: Butterworth BE, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, editors. Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. New York: Plenum Press, p 115-137.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P. 1999. Are metals dietary carcinogens? Mutat Res 443: 157-181.
- Santos-Mello R, Cavalcante B. 1992. Cytogenetic studies on gas station attendants. Mutat Res 280: 285-290.
- Schegel R, McGregor JT. 1984. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomised Fisher 344 rats: Implications for cytogenetic screening. Mutat Res 127: 169-174.

- Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. 2000a. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental *in vivo* biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biology* 23: 241-245.
- Silva J, Freitas TRO, Heuser V, Marinho JR, Bittencourt F, Cerski CTS, Kliemann LM, Erdtmann B. 2000b. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutat Res* 470: 39-51.
- Silva J, Freitas TRO, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B. 2000c. Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environ Mol Mutagen* 35: 270-278.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
- Srám RJ, Holá N, Kotesovec F, V'Ávra R. 1985. Chromosomal abnormalities in soft coal open-cast mining workers. *Mutat Res* 144: 271-275.
- Srám RJ, Benes I, Binková B, Dejmeč J, Horstman D, Kotesovec F, Otto D, Perreault SD, Rubes J, Selevan SG, Skalík I, Steves RK, Lewtas J. 1996. Teplíce program - The impact of air pollution on human health. *Environ Health Persp* 104: 699-714.
- Talmage SS, Walton BT. 1991. Small Mammals as Monitors of Environmental Contaminants. *Reviews of Environ Contam T* 119: 47-145.
- Tice RR. 1995. The single cell gel comet assay: a microgel electrophoretic technique for detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venit S., editors. *Environmental Mutagenesis*: Oxford: Bios Scientific Publishers, p 315-339.
- Tice RR, Erexson GL, Hilliard CJ, Huston JL, Boehn RM, Gulati D, Shelby MD. 1990. Effect of treatment protocol and sample time on the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutagenesis* 5: 313-321.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki YF. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221.

- Wesp HF, Tang X, Edenharder R. 2000. The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soil: contamination with, fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in he *Salmonella*/reversion assay and effects of solvent fractions on the sister-chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and in the vivo mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat Res* 472: 1-21
- Wilks BJ. 1963. Some aspects of ecology and population dynamics of the pocket gopher (*Geomys bursarius*) in southern Texas. *Tex J Sci* 15: 241-283.
- Yu M-H. 2001. *Environmental Toxicology: Impacts of environmental toxicant on living systems*. Boca Raton: Lewis Publishers, 255 p.
- Zuninga-González G, Torres-Bugarim O, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ventura-Aguilar AJ, Ramos-Mora A, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Gallegos-Arreola MP. 2001a. Variation of Micronucleated Erythrocytes in Peripheral Blood of *Sciurus aureogaster* in Relation to Age: An Increment of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes after the administration of colchicine. *Environ Mol Mutagen* 37: 173-177.
- Zuninga-González G, Torres-Bugarim O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Martínez-González S, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Ramos-Mora A, Ontiveros-Lira D, Gallegos-Arreola MP. 2001b. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including human spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat Res* 494: 161-167.

TABLE I. Mean Frequency of Micronucleated Erythrocytes Polychromatic (mPCE) and Normochromatic (mNCE) by Gender Observed in Blood Cells of *Ctenomys minutus* from Maribo, Weber and Amaral

SITE	N ^a	Gender	mPCE ^b	mNCE ^b
Maribo	27	Female	0.7 ± 0.7	0.1 ± 0.2
	14	Male	1.3 ± 1.2	0.4 ± 0.6
Weber	23	Female	0.7 ± 0.8	0.1 ± 0.2
	18	Male	0.9 ± 0.9	0.2 ± 0.4
Amaral	23	Female	0.9 ± 1.0	0.2 ± 0.3
	18	Male	1.3 ± 0.7	0.4 ± 0.5

^a Number of animals per group

^b Mean value (‰) ± standard deviation

TABLE II. Comparisons Between Age Groups, to Each Site Group, of Micronucleated Erythrocytes Polychromatic (mPCE) and Normochromatic (mNCE) Observed in Blood Cells of *Ctenomys minutus*

Site	N ^a	Age Groups	mPCE ^b	mNCE ^b
Maribo	17	Subadult	0.8 ± 0.7	0.1 ± 0.4
	24	Adult	1.2 ± 1.3	0.03 ± 0.1
Weber	12	Subadult	0.8 ± 0.8	0.3 ± 0.5
	39	Adult	0.8 ± 0.9	0.2 ± 0.4
Amaral	17	Subadult	1.3 ± 0.9	0.4 ± 0.5
	24	Adult	1.0 ± 0.9	0.1 ± 0.2

^a Number of animals per group

^b Mean value (‰) ± standard deviation

TABLE III. Number and Mean Values of Micronucleated Erythrocytes Polychromatic (mPCE) and Normochromatic (mNCE) Observed in Blood Cells of *Ctenomys minutus* from Maribo, Weber and Amaral

Season (Year)	Maribo			Weber			Amaral		
	N ^a	mPCE ^b	mNCE ^b	N ^a	mPCE ^b	mNCE ^b	N ^a	mPCE ^b	mNCE ^b
Winter (2000)	16	1.1 ± 0.8	0.1 ± 0.7	14	1.0 ± 0.9	0.2 ± 0.4	13	1.4 ± 0.8	0.2 ± 0.4
Spring (2000)	6	1.0 ± 1.3	0.2 ± 0.4	9	1.0 ± 1.0	0.2 ± 0.4	10	1.5 ± 1.2	0.2 ± 0.4
Summer (2001)	12	1.7 ± 2.8	0.2 ± 0.6	11	0.7 ± 1.0	0.0 ± 0.0	9	0.8 ± 1.0	0.6 ± 0.5
Autumn (2001)	7	0.7 ± 0.8	0.3 ± 0.8	7	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	9	1.2 ± 1.5	0.1 ± 0.3
Total	41	1.1 ± 1.0	0.2 ± 0.4	41	0.8 ± 0.9	0.2 ± 0.3	41	1.2 ± 0.9	0.3 ± 0.4

^a Number of animals per group

^b Mean value (%) ± standard deviation

TABLE IV. Detection of DNA Damage in Blood Leukocytes of *Ctenomys minutus* from Maribo, Weber and Amaral, Captured, from Winter/2000 to Autumn/2001 and Internal Control (IC)

Season (Date)	Site	N ^a	DNA Image Length (µm) ^b	Damage Index ^b	Damage Frequency (%) ^b	Mean Temp.(°C) ^c	Mean NO ₂ (µg/m ³) ^d	Mean Traffic/Day ^e
Winter (August 17)	IC	04	27.6 ± 9.8	23 ± 13.2	7.5 ± 3.9	-	-	-
(July 25)	Maribo	16	27.2 ± 12.0	15.2 ± 6.9	5.0 ± 2.2	14	0±0	4900
(August 1)	Weber	14	28.2 ± 12.3	26.1 ± 18.2*	9.8 ± 4.5***	8	15.4±2	5000
	Amaral	13	30.4 ± 17.2	33.2 ± 20.9**	11.0 ± 5.8***	15	8.1±0.4	4600
Spring (November 17)	IC	03	28.5 ± 17.4	18.7 ± 12.0	6.3 ± 3.1	-	-	-
(November 21)	Maribo	06	28.9 ± 12.8	27.5 ± 22	10.0 ± 6.1	14	7.9±1.4	6200
(November 28)	Weber	09	29.3 ± 15.0	30.6 ± 25	11.1 ± 7.0	19	13.3±0.7	8200
	Amaral	10	32.6 ± 20.3	48.1 ± 30.8	14.4 ± 7.7	16	8.8±0.8	7400
Summer/97 (March 19)	IC	04	26.6 ± 6.3	12.5 ± 11.7	5.3 ± 3.9	-	-	-
(March 13)	Maribo	12	28.2 ± 13.5	19.6 ± 15.5	6.3 ± 4.4	26	2.5±0.7	6400
(March 6)	Weber	11	27.5 ± 8.7	16.7 ± 17.5	5.9 ± 5.1	25	8.6 ^f	8300
	Amaral	09	28.3 ± 11.9	27.0 ± 19.0	11.1 ± 7.2	27	13.2±0.9	8900
Autumn (May 21)	IC	03	27.4 ± 15	13.3 ± 4.0	4.7 ± 1.6	-	-	-
(June 4)	Maribo	07	28.5 ± 15	20.1 ± 20.2	6.7 ± 5.6	12	7.3±1.5	5500
(May 24)	Weber	07	28.0 ± 11.9	17.6 ± 23.7	6.3 ± 7.0	17	10.8±1.3	5700
	Amaral	09	29.6 ± 16.8	25.4 ± 21.1	8.8 ± 6.2	20	9±0.1	4800
Annual Average (2000-2001)	IC	14	27.5 ± 11.1	16.8 ± 10.8	5.9 ± 3.2	-	-	-
	Maribo	41	28 ± 13.1	19.1 ± 14.9	6.4 ± 4.4	16.5 ± 6.4	4.4 ± 3.6	5750
	Weber	41	28.2 ± 11.8	23.1 ± 20.6	8.5 ± 5.9*	17.3 ± 7.0	12.5 ± 2.7***	6800
	Amaral	41	30.7 ± 17.2	33.8 ± 24.1***	12.2 ± 7***	19.5 ± 5.4	9.8 ± 2.2***	6425

^a Number of animals per group; ^b Mean values obtained from average of 100 cells per animal; ^c Temp.= temperature during three days before capture; data was provided by; Meteorology Institute – DISME; ^d Mean values obtained from average of samples from previous week; ^e Mean number of vehicles per day during previous week; data was provided by CONCEPA (Highway Concessionary); ^f value obtained from one Palme tube; * Significant data in relation to Maribo group at $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ / two-tailed Student's test

TABLE V. Mean Values of Damage Index in Blood Cells of *Ctenomys minutus* by Site and Gender, Besides DNA Image Length and Damage Frequency

Site	N ^a	Gender	DNA Image Length (μm) ^b	Damage Index ^b	Damage Frequency (%) ^b
Maribo	27	Female	27.7 ± 12.3	16.8 ± 15.5	5.6 ± 4.4
	14	Male	28.5 ± 14.6	23.6 ± 13.2	7.9 ± 4.1
Weber	23	Female	28.1 ± 11.9	22.9 ± 17.0	8.4 ± 4.7
	18	Male	28.3 ± 11.7	23.4 ± 25.0	8.6 ± 7.4
Amaral	23	Female	30.90 ± 18.9	37.7 ± 21.4***	12.2 ± 6.0
	18	Male	29.5 ± 14.0	28.8 ± 27.0	10.3 ± 7.6

^a Number of animals per group

^b Mean values obtained from average of 100 cells per animal

*** Data significant in relation to Maribo group at $P < 0.001$ / two-tailed Student's test

TABLE VI. Comparisons Between Age Groups, to Each Site Group, of Damage Index (DI), DNA Image Length and Damage Frequency in Blood Samples of *Ctenomys minutus*

Site	N ^a	Age Groups	DNA Image Length (μm) ^b	DI by Age ^b	Damage Frequency (%) ^b
Maribo	17	Subadult	29.5 ± 16.9	27.7 ± 18.1	8.6 ± 5.1
	24	Adult	26.9 ± 10.4	13.1 ± 8.2	4.8 ± 3.0
Weber	12	Subadult	30.7 ± 16.9	37.5 ± 26.4	11.6 ± 7.7
	29	Adult	27.2 ± 9.7	17.2 ± 14.4	7.1 ± 4.6
Amaral	17	Subadult	30.6 ± 16.8	37.7 ± 27.6	12.9 ± 8.5
	24	Adult	30.1 ± 16.7	31.0 ± 21.5***	10.3 ± 5.0

^a Number of animals per group

^b Mean values obtained from average of 100 cells per animal

*** Data significant in relation to Maribo group at $P < 0.001$ / two-tailed Student's test

Table VII. Concentrations, in Arbitrary Units, of Some Metals Related to Automobiles Exhaust (Cr, Ni, Cu and Zn) Found in the Soil Samples. The Values Quoted represent the Net Values, i.e. Discounting the Background Due to the Wax Used as a Binder.

	Chromium	Nickel	Copper	Zinc
Maribo	8.2 ± 1.6	3.1 ± 1.5	10.0 ± 1.7	14.7 ± 2.0
Weber	43.2 ± 2.0	20.9 ± 2.1	25.6 ± 2.4	61.8 ± 3.4
Amaral	30.2 ± 1.8	14.8 ± 1.8	17.4 ± 2.0	52.7 ± 3.1

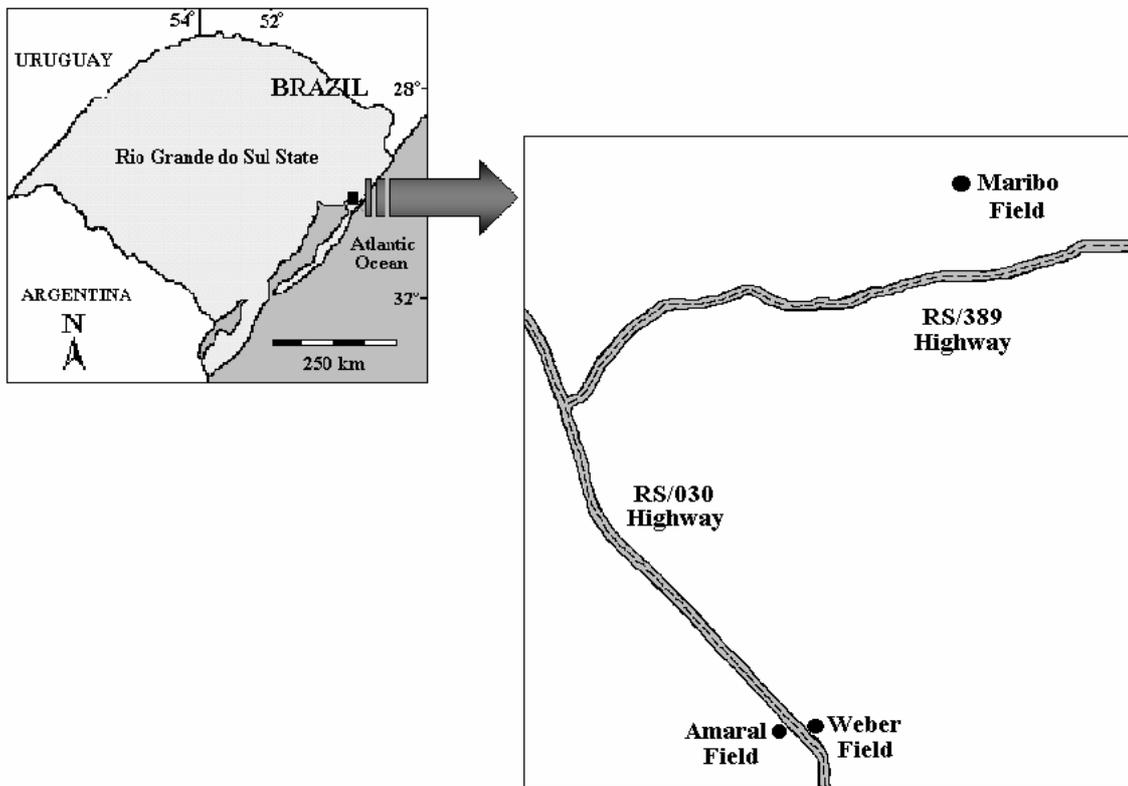


Figure 1.

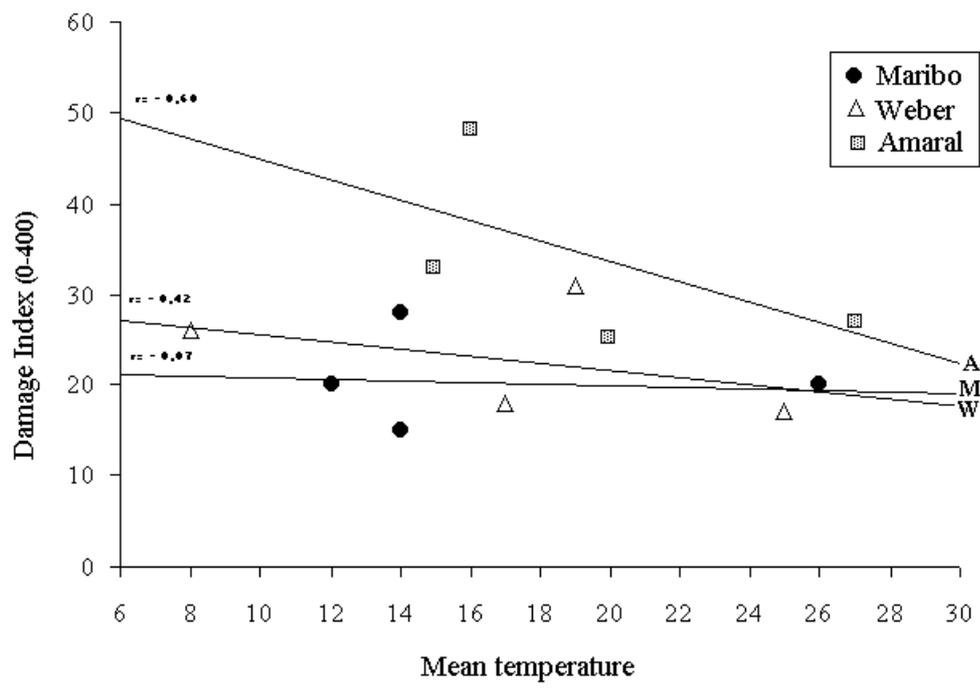
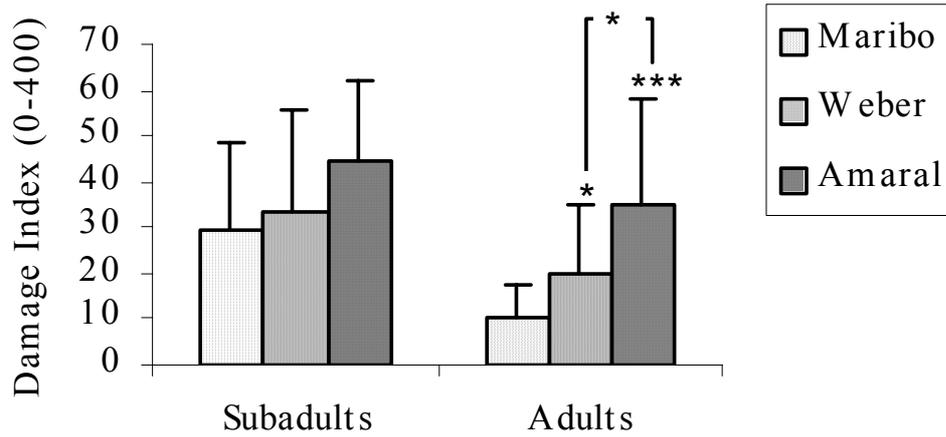
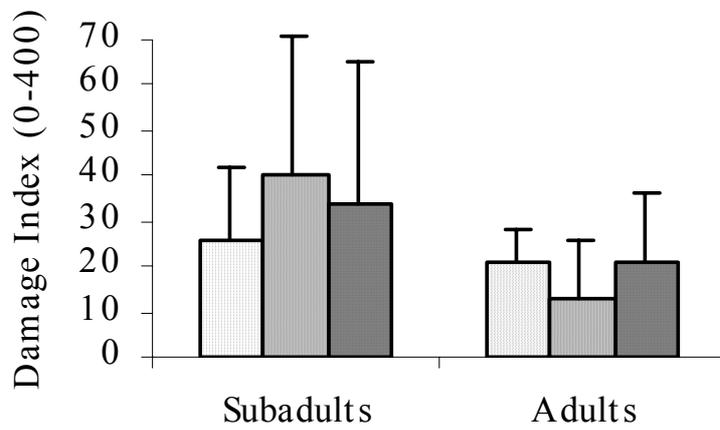


Figure 2.



(a) Females



(b) Males

Figure 3.

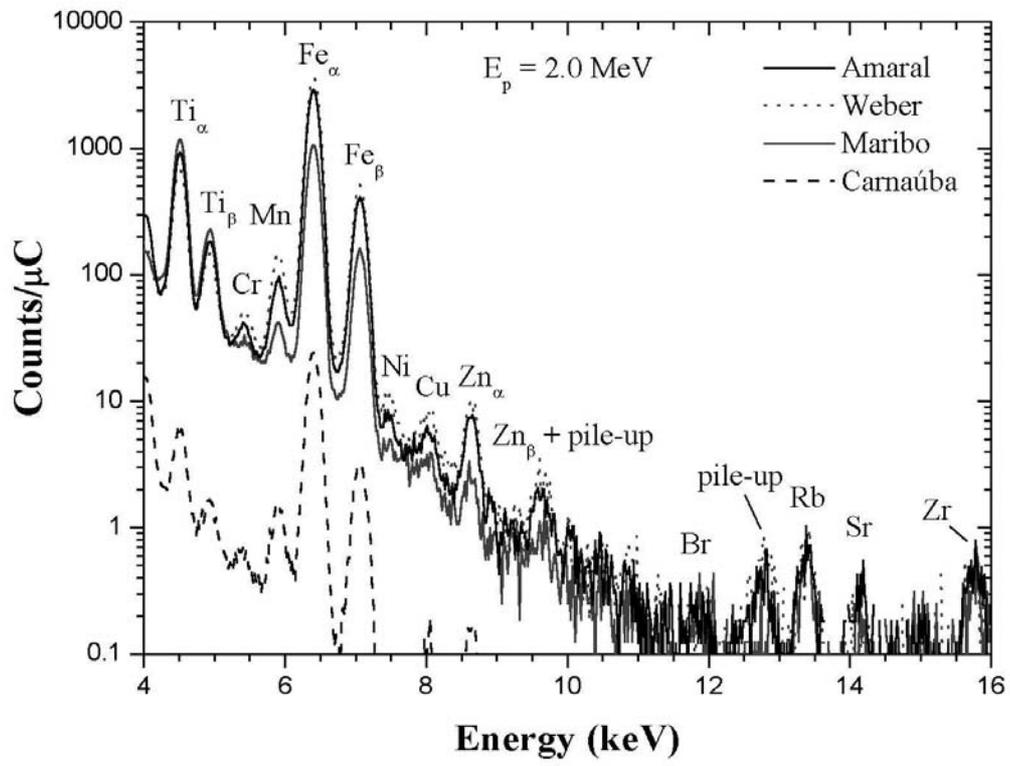


Figure 4.

Fig. 1. Geographic places of sampling sites and study area

Fig. 2. Linear regression analysis obtained from mean damage index and temperature from each site and season that *Ctenomys minutus* were captured. M, W and A represent Maribo field ($Y=21.8-0.10X$), Weber field ($Y=29.8-0.4X$) and Amaral field ($Y=55.5-1.1X$), respectively. Maribo, circles; Weber, triangles; Amaral squares.

Fig. 3. (a) Detection of DNA damage in blood leukocytes of female *Ctenomys minutus* by age from Maribo (9 subadults and 18 adults), Weber (5 subadults and 18 adults) and Amaral (6 subadults and 17 adults) field. (b) Detection of DNA damage in blood leukocytes of male *Ctenomys minutus* by age from Maribo (8 subadults and 6 adults), Weber (7 subadults and 11 adults) and Amaral (11 subadults and 7 adults) field. Mean values obtained from average of 100 cells per animal. * Data significant in relation to female adults from Maribo field group at $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$; ** data significant in relation to female adults from Weber field group at $P < 0.01$ / two-tailed Student's test.

Fig. 4. PIXE spectra obtained with 2.0 MeV protons and an average current of 10 nA. The number of counts of all spectra were normalized to the integrated charge of each run. Some pile-up is observed due to the high count rates involved in the experiments. See text for further details.

4. DISCUSSÃO GERAL *

* as figuras aqui citadas se referem às contidas no artigo (item 3)

Nos últimos 25 anos muitas mudanças na engenharia dos veículos e seus combustíveis reduziram enormemente as emissões tóxicas dos motores à combustão. Os automóveis de hoje são capazes de emitir 90% menos poluentes que os modelos de 1970, ônibus e caminhões também são projetados para lançarem ao ambiente menos da metade dos poluentes que emitiam anteriormente. Entretanto, o número de veículos circulantes e as distâncias que eles percorrem cresce continuamente (EPA, 1994a).

Vários testes têm sido desenvolvidos para monitorar o risco biológico causado pelos poluentes, mas poucos estudos têm sido realizados para avaliar o potencial genotóxico associado a exposição em mamíferos (Baker e cols., 1996; Cotelle e Férrard, 1999; Silva e cols., 2000b), bem como para avaliar o impacto crônico dos contaminantes nos organismos (Belpaeme e cols., 1998). Os *C. minutus* são roedores fossoriais, herbívoros, e que normalmente vêm à superfície para se alimentar e limpar seus túneis, que cavam com auxílio de patas e dentes. Desta forma, acabam entrando em contato com os contaminantes presentes no solo e nas plantas, e também expondo seu microhabitat à atmosfera com ou sem poluentes. Para verificar os efeitos da exposição crônica às emissões dos automóveis, neste estudo se utilizou o Ensaio Cometa e o Teste de Micronúcleos em amostras de sangue periférico de *C. minutus*.

Danos causados por poluentes emitidos pelos motores dos veículos, que utilizam diferentes combustíveis, têm sido descritos por muitos autores, utilizando-se diferentes organismos e testes, como por exemplo: *Salmonella typhimurium* (Crebelli e cols., 1995; Edenharter e cols., 2000; Wesp e cols., 2000); espécies sentinelas (Ahmed e cols., 1998) e humanos como atendentes de postos de gasolina (Hogsted, 1991; Santos-Mello & Cavalcante, 1992; Carere e cols., 1998; Gattás e cols., 2001). Quanto as técnicas para se verificar efeitos genotóxicos e citotóxicos, têm sido mais utilizadas as que avaliam aberrações cromossômicas (Carere e cols., 1998; Wesp e cols., 2000), deleções (Santos-Mello & Cavalcante, 1992), micronúcleos (Hogsted e cols., 1991; Gattás e cols., 2001), e troca de cromátides irmãs (Ahmed e cols., 1998). A maioria desses estudos demonstrou aumento de dano de forma não significativa nos organismos expostos às emissões dos automóveis. De forma similar, nossos resultados demonstraram para *C. minutus*, expostos permanentemente às emissões veiculares, aumento não significativo de células

micronucleadas (Tabelas I, II e III), mas aumento significativo de células com danos no DNA (Tabelas IV, V, VI, Fig. 2 e 3). O Ensaio Cometa (EC) demonstrou maior sensibilidade, resultando em diferenças claras entre os grupos avaliados, como no que se refere às áreas de estudo, idade e sexo dos roedores.

Os resultados obtidos com o Teste de Micronúcleos (MN) e EC demonstraram diferenças óbvias de sensibilidade, que se tornam evidentes quando se observa as Tabelas III e IV. Com o Teste de MN não houveram variações na frequência de células micronucleadas, por estação do ano, então diferenças sazonais não puderam ser observadas. Mas através do EC pequenas variações sazonais foram observadas, indicando a alta sensibilidade deste teste. Estas diferenças entre os testes pode ser explicada pelo mecanismo biológico que ocorre em alguns organismos (p. ex. ratos) em que o baço captura e destrói eritrócitos micronucleados presentes na circulação (Schegel & McGregor, 1984). Portanto, o Teste de Micronúcleos é considerado menos eficiente que outros testes, quando se trata de agentes não considerados como fortes indutores de danos ao DNA. Apesar disso, este teste é bem aceito internacionalmente (CSGMT, 1992; Holden e cols., 1997; Hayashi e cols., 2000), principalmente quando não é recomendado o sacrifício dos animais. A possibilidade do baço capturar e destruir eritrócitos micronucleados em *C. minutus* pode ser reforçada pela diferença observada entre as frequências médias de eritrócitos jovens (EPC) e maduros (ENC) com MN. Os valores menores de ENC que EPC com MN, por local, demonstrou que as células micronucleadas não continuam na circulação.

Valores significativamente altos de danos, observados pelo EC, foram encontrados no inverno de 2000 (Tabela IV), quando comparados às demais estações nos três locais. Muitos estudos, em diferentes países, também descrevem variações na concentração de agentes danosos e de mutagenicidade relacionados com temperatura, com o máximo ocorrendo durante o inverno (Barale e cols., 1989; Srám e cols., 1996; Budzinski e cols., 1997; Edenharder e cols., 2000; Silva e cols., 2000b). Em alguns destes trabalhos o tráfego veicular foi identificado como o único produtor possível de mutágenos aéreos. A análise de regressão linear, referente a temperatura X danos (Fig. 2), demonstra concordância com esses estudos, onde se observa uma relação inversa entre temperatura e dano, embora esta não tenha apresentado correlação estatisticamente significativa. Também se observa na Tabela IV que a média do tráfego durante o verão foi mais alta que no inverno. Sendo assim, por serem emitidas maiores quantidades de poluentes no verão, o esperado seria que nesta estação os organismos apresentassem maior número de lesões no DNA, e não no inverno. Mas considerando que mutágenos gerados pelas emissões na atmosfera são também mutágenos no solo, e sendo os *C. minutus*, roedores fossoriais, estando assim em

contato direto com os poluentes, estes podem ser modificados por microrganismos e microflora presentes do solo (Edenharder e cols., 2000). Também a inativação fotoquímica mais lenta e a redução na volatilização dos mutágenos aéreos ocorre no inverno (temperaturas mais baixas), do mesmo modo que o aumento das taxas de deposição de mutágenos associados com material particulado no ar, que precipitam com ou sem umidade (Edenharder e cols., 2000), explicando assim a relação encontrada entre menos emissões, baixas temperaturas e maiores danos.

As emissões dos veículos se encontram associadas aos níveis de NO_2 no ambiente [Krupa & Legge, 2000]. As dosagens de NO_2 realizadas em ambos os lados dos campos expostos às emissões, Weber e Amaral, durante todas as estações do ano foram similares (Tabela IV). No Campo Maribo não foi observada a mesma associação (NO_2 X tráfego), o que se explica devido a sua distância da estrada (Fig.1). Fatores meteorológicos determinam o modo com que os contaminantes são dispersos e movidos pela troposfera. A força predominante no transporte da poluição, incluindo NO_2 , é o vento, fazendo com que os contaminantes movam-se predominantemente na direção deste (Peirce e cols., 1998). Segundo Hasenack e Ferraro (1989) o vento predominante nas regiões de estudo é noroeste durante o inverno e nordeste durante o verão. Devido a localização geográfica da estrada RS/030 (Fig. 1), é possível compreender os dados obtidos para NO_2 , onde no inverno mostraram valores mais altos no lado da estrada referente ao Campo Weber, e no verão no lado referente ao Campo Amaral. Apesar desses resultados concordantes, a média anual de NO_2 no lado do Campo Amaral mostrou valores mais baixos que no lado Weber, sendo que os animais apresentaram frequência e índice de dano mais altos no Campo Amaral, assim não sendo observada a mesma associação. Embora a diferença de NO_2 nos campos Amaral e Weber não tenha sido significativa, pode-se observar que o vento durante todo o ano foi em geral nordeste, então o Campo Weber encontrava-se a barlavento (de onde o vento vem), e o Campo Amaral a sotavento (para onde o vento vai) em relação à estrada, desta forma o lado que recebe o vento está mais diretamente exposto às emissões. Krupa e Legge (2000) discutem algumas limitações dos amostradores passivos, onde os efeitos da velocidade do vento, radiação, temperatura e umidade relativa podem alterar as funções de absorção/adsorção e taxas de amostragem, fornecendo sub- ou superestimativas da exposição cumulativa. Também, o que pode ter interferido nas dosagens, tenha sido os locais de fixação dos amostradores.

Suporte adicional para a hipótese de que o Campo Amaral é mais exposto às emissões, devido à predominância do vento, é a observação de que a amostra do solo deste campo apresentou maior concentração de hidrocarbonetos totais (5500 ppm), em relação ao

Weber (4500 ppm) e Maribo (4000 ppm). Maior concentração de hidrocarbonetos no Campo Maribo em relação ao Campo Weber pode ser explicado pelo fato de que nem todos os hidrocarbonetos são formados pela atividade humana. Existem evidências de que os hidrocarbonetos também podem ser formados pela biossíntese direta de micróbios e plantas (Yu, 2001), mas os hidrocarbonetos mais comuns emitidos desta maneira são isopireno e vários terpenóides (Freedman, 1995). Uma vez que reações fotoquímicas envolvendo NO_x e O₃ são responsáveis pela transformação em alguns hidrocarbonetos tóxicos, estes fatos correspondem ao observado nos animais do Campo Maribo, que demonstraram menos danos que os do Weber.

As concentrações de metais (cromo, cobre, níquel e zinco) das amostras de solo dos campos Weber e Amaral (Weber > Amaral) mostraram-se mais altas que do controle (Maribo) (Fig. 4 e 5), sem demonstrar mesma distribuição que dos hidrocarbonetos (Amaral > Weber). Esta diferença pode ser explicada devido ao transporte dos hidrocarbonetos na atmosfera ocorrer em forma de vapor ou absorvido em material particulado, que embora também ocorra com os metais, sua distribuição no solo, vegetação e atmosfera é observada principalmente próxima das estradas (Freedman, 1995). Dos metais encontrados, o Cu e Zn não são normalmente considerados mutagênicos; os compostos de Ni são considerados como mutágenos fracos na maioria dos testes tradicionais com sistemas de mamíferos; e Cr é o único destes metais encontrados com efeitos mutagênicos fortes (Rojas e cols., 1999). Os mesmos autores também sugerem que a indução de danos causados por metais ocorrem pela produção de quebras simples na cadeia de DNA, as quais são rapidamente reparadas.

Adultos e subadultos foram comparados (Tabelas II e VI) para demonstrar a possível relação entre idade e dano. Nenhuma diferença significativa de indução de danos foi encontrada entre as idades com o Teste de MN. Mas com o EC, os subadultos da área controle (Maribo) apresentaram duas vezes mais células com danos no DNA que os adultos (Tabela VI). Esta observação não é evidente nos Campos Weber e Amaral, devido a ambos os campos estarem expostos a poluetes. Zúñiga-Gonzáles e cols. (2001a; 2001b), mostraram resultados similares para muitas espécies, nas quais os animais jovens apresentaram mais danos espontâneos que os adultos. Por outro lado, Silva e cols. (2000b) não encontrou diferença de danos espontâneos entre subadultos e adultos de *C. torquatus*. Embora tenham sido encontrados resultados diferentes para animais do mesmo gênero (*Ctenomys*), diferenças metabólicas específicas da idade são observadas em certos grupos de roedores (Mugford & Kedderis, 1998).

Machos e fêmeas também foram comparados (Tabelas I e V), através do Teste de MN e EC, mostrando resultados estatisticamente similares, sem diferença entre os sexos por local. Já as Tabelas V e VI (EC) demonstram aumento significativo de danos no DNA das fêmeas e adultos do Campo Amaral, quando comparados com machos e subadultos do Campo Maribo, respectivamente. Do mesmo modo, a Figura 3 mostra que somente as fêmeas adultas das regiões expostas às emissões dos veículos apresentaram resposta significativa aos poluentes. Assim, fêmeas demonstram ter taxas mais altas no metabolismo de xenobióticos que os machos, o que é comum devido aos hormônios sexuais femininos (Mugford & Kedderis, 1998). De forma controversa, os mesmos autores comentam que as diferenças dependentes do sexo podem produzir a eliminação mais lenta dos químicos no sexo com menor taxa no metabolismo, resultando em uma meia-vida prolongada e alta concentração de componentes no sangue, que causa toxicidade. Sendo que por outro lado, se um metabólito é produzido, o sexo com metabolismo mais baixo é menos suscetível a toxicidade induzida por químicos específicos. Além disso, variações dependentes do sexo no metabolismo de roedores pode ser resultado da evolução diferencial de isoformas de citocromo P450 em mamíferos.

Sobre os adultos expostos às emissões (Amaral) apresentarem um aumento significativo de células com danos em relação ao controle, resultado similar associado com idade foi encontrado em um estudo onde baleias se encontravam expostas a HAP, no qual os adultos mostraram aumento da expressão do citocromo P450 quando comparados aos jovens (Moore e cols., 1998).

Algumas das dificuldades dos trabalhos com biomonitoramento de regiões expostas a poluentes têm sido identificar componentes individuais que possam ser responsáveis pelos efeitos danosos. Além do que, amostras obtidas do ambiente são misturas complexas de componentes orgânicos e inorgânicos, consistindo em centenas de componentes individuais, que podem interagir produzindo efeitos aditivos, potencializados, sinérgicos ou antagônicos, bem como diferenças são encontradas entre os metabolismos das espécies (Talmage & Walton, 1991).

Este estudo obteve dados químicos e biológicos sobre áreas expostas às emissões dos veículos, mostrando associação entre hidrocarbonetos, metais e NO₂ com os níveis de danos no DNA observados nas células de sangue periférico do roedor nativo *C. minutus*. Nossos resultados estão de acordo com estudos sobre emissões, onde se observou pouco aumento de danos em roedores nativos expostos às emissões dos automóveis, sendo que o EC teve maior sensibilidade, demonstrando diferenças sazonais/temperatura, idade e sexo.

O resultado negativo na avaliação de MN em eritrócitos do sangue periférico, teste estes que mede o dano não reparado no DNA, sugere que embora o EC tenha mostrado que as fêmeas adultas são as principais afetadas pelos poluentes aos quais estão expostas, os danos observados podem ser rapidamente reparados e/ou eliminados.

Finalmente, a genotoxicidade *in vivo* das emissões dos veículos pode ser biomonitorada através do Ensaio Cometa versão alcalina. Entretanto, outros estudos ainda se fazem necessários para a melhor compreensão sobre o metabolismo de xenobióticos em *C. minutus*, e quais fatores específicos possam estar afetando os resultados da exposição às emissões.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Existe um número crescente de componentes químicos lançados ao meio ambiente, muitos dos quais são capazes de induzir efeitos danosos adversos à saúde de animais e humanos, representando uma causa importante de preocupação por seus possíveis efeitos a longo prazo. O impacto ecológico e os riscos a saúde dos organismos associados com a exposição a poluentes ambientais são extremamente difíceis de se avaliar devido a muitos desses componentes serem parte de misturas complexas. Os gases produzidos pelos motores dos veículos à combustão contém diversos poluentes sabidamente genotóxicos, como óxidos de nitrogênio (NO_x), monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SO_x), hidrocarbonetos (HC) e seus derivados, bem como particulados, e metais (cádmio, cromo, cobre, níquel, vanádio, zinco e chumbo). Todos esses compostos isolados ou associados a outros elementos são tóxicos ou de efeito danoso aos organismos, de forma não totalmente esclarecida.

Este estudo teve como objetivo verificar o possível efeito genotóxico das emissões dos automóveis em roedor nativo *Ctenomys minutus* cronicamente exposto, através do Ensaio Cometa (EC), comparando os resultados com o Teste de Micronúcleos (MN), ambos em sangue periférico. Levando em consideração alguns fatores que pudessem influenciar os resultados dos testes de genotoxicidade, este trabalho ainda teve como objetivos: identificar a presença de alguns agentes envolvidos na poluição gerada pelos veículos; verificar possíveis diferenças sazonais, como temperatura e ventos; e se existe influência da idade e sexo dos roedores.

Os *C. minutus* (Octodontidae-Rodentia), foram capturados em dois campos diferentes, ambos ao lado da estrada RS/030, na cidade de Osório, Estado do Rio Grande do Sul (RS): (a) Amaral, e (b) Weber. Animais para controle externo foram capturados no Campo Maribo à cerca de 3 km de distância de outra estrada (RS/389-Osório/RS), conseqüentemente afastada das emissões dos veículos. No final do período desse estudo, foram capturados 123 animais (73 fêmeas e 50 machos). Os resultados e conclusões mais importantes estão resumidos abaixo:

- 1) os roedores cronicamente expostos às emissões dos veículos não demonstraram aumento nas células micronucleadas (MN), mas aumento de células com dano no DNA, através do EC, incluindo pequenas variações por estação, sexo e idade, que demonstraram a alta

sensibilidade deste teste. Essa diferença entre as metodologias pode ser explicada pelo mecanismo biológico que ocorre em alguns organismos (p.ex. ratos) em que o baço captura e destrói eritrócitos micronucleados na circulação sanguínea. Essa hipótese pode ser reforçada pelas menores frequências de eritrócitos jovens em comparação aos maduros com MN, EPC (eritrócitos policromatófilos) e ENC (eritrócitos normocromatófilos), respectivamente, por local de coleta, sugerindo que as células com MN não continuaram na circulação sanguínea;

2) valores significativamente aumentados de danos foram observados no inverno de 2000, em comparação com as outras estações, em todos os locais de coleta. A análise de regressão linear sugere uma tendência de relação inversa entre temperatura e danos, mas não foi demonstrada correlação estatisticamente significativa. Estes achados estão de acordo com dados da literatura;

3) o tráfego médio durante o verão foi maior do que no inverno, sendo assim maior quantidade de poluentes foram lançados ao ambiente nesta estação. A inativação fotoquímica mais lenta e menor volatilização dos mutágenos ocorre no inverno, juntamente com o aumento da taxa de deposição em forma de material particulado transportado pelo ar até a superfície do solo; estes fatores podem explicar a relação entre baixas temperaturas, menor fluxo de veículos e maior dano nas células dos *C. minutus* que, devido ao seu habitat fossorial, estão diretamente em contato com o solo;

4) o nível de NO₂, que é associado com as emissões dos veículos, foi similar nos lados da estrada referentes aos campos Weber e Amaral em todas as estações. No Campo Maribo não foi verificada a mesma associação (NO₂ X tráfego) devido ao fato de que sua localização ser distante da estrada. A força predominante no transporte da poluição, incluindo gases como o NO₂, é o vento, fazendo com que os poluentes movam-se predominantemente na direção deste. O vento predominante nas regiões de estudo é noroeste durante o inverno e nordeste durante o verão. Devido a localização geográfica da estrada RS/030, é possível compreender os dados obtidos para NO₂, os quais mostraram no inverno valores mais altos no lado da estrada referentes ao Campo Weber, e no verão valores mais altos no Campo Amaral. Apesar deste resultado, o lado do Campo Amaral mostrou menor concentração média anual de NO₂, e os animais maiores índices e frequências de danos que os do Weber. Embora esta diferença de NO₂ não tenha sido significativa, a direção do vento durante todo o ano é em geral nordeste, portanto o Campo Weber encontra-se a barlavento (de onde vem o vento), e o Campo Amaral a sotavento (para onde o vento vai) em relação à estrada, sendo este mais diretamente exposto às emissões.

Portanto, conforme outros trabalhos, algumas limitações dos amostradores passivos podem resultar em sub- ou superestimativas da exposição cumulativa;

5) suportes adicionais para a hipótese de que o Campo Amaral é mais exposto às emissões, devido a predominância do vento, surgem com a presença aumentada de hidrocarbonetos totais em amostras do solo deste campo (5500 ppm), quando comparado aos Campos Weber (4500 ppm) e Maribo (4000 ppm). A concentração maior de hidrocarbonetos no Campo Maribo em relação ao Weber pode ser explicado pelo fato de que os hidrocarbonetos não são todos formados pela atividade humana. Uma vez que reações fotoquímicas envolvendo NO_x e O_3 são responsáveis pela transformação de hidrocarbonetos em formas tóxicas, pode ser esse o motivo pelo qual os animais do Campo Maribo (controle) mostraram menos danos no DNA que os do Campo Weber;

6) as concentrações de cromo, cobre, níquel e zinco das amostras de solo dos campos Weber e Amaral (Weber > Amaral) mostraram-se valores mais altos que no controle (Maribo), mas sem demonstrar a mesma distribuição que os hidrocarbonetos nesses campos (Amaral > Weber). Esta diferença pode ser explicada devido ao transporte dos hidrocarbonetos na atmosfera ocorrer associado ao material particulado, o que embora também ocorra com os metais, a distribuição no solo, vegetação e atmosfera é observada principalmente próxima das estradas. Dos metais encontrados, o Cu e Zn comumente não considerados como mutagênicos; o Ni considerado mutágeno fraco na maioria dos testes tradicionais com sistemas mamíferos; e Cr sendo o único destes metais encontrados com efeitos mutagênicos fortes. Além disso, segundo alguns trabalhos, a indução de dano causado por metais ocorre com a produção de quebras simples na cadeia de DNA, as quais são rapidamente reparadas;

7) os danos em adultos e subadultos por local foram comparados para verificar uma possível relação, sem que nenhuma diferença significativa fosse encontrada. No entanto, os subadultos do campo controle (Maribo) apresentaram duas vezes mais células com danos no DNA que os adultos do mesmo local. Alguns estudos mostram resultados similares para muitas espécies, onde os jovens apresentam maior número de danos espontâneos quando comparados aos adultos. Embora diferentes resultados tenham sido encontrados para o mesmo gênero (*Ctenomys*), onde *C. torquatus* expostos ao carvão não demonstraram essa diferença, variações no metabolismo específicas da idade são observadas em certos grupos de roedores. Diferenças entre adultos e subadultos não foram evidentes nos animais dos campos Weber and Amaral devido ao fato desses campos estarem expostos aos poluentes;

8) as medidas de dano no DNA entre machos e fêmeas foram similares estatisticamente, em ambos testes utilizados (MN e EC). No entanto, as fêmeas adultas das regiões expostas às emissões dos automóveis apresentaram resposta significativa aos poluentes, indicando terem taxas mais altas no metabolismo de xenobióticos que os machos, o que é mais comum devido aos hormônios sexuais femininos. Essas variações dependentes do sexo no metabolismo dos roedores pode ser resultado da evolução de diferentes isoformas do citocromo P450 nos mamíferos. O resultado negativo para a indução de MN nos eritrócitos do sangue periférico, sugere que embora as fêmeas adultas tenham sido as principais afetadas pelos poluentes gerados pelos veículos automotores, este tipo de dano pode ser rapidamente eliminado e/ou reparado;

Algumas das dificuldades dos trabalhos com biomonitoramento ambiental tem sido identificar componentes individuais que possam ser responsáveis pelos efeitos danosos associados com a exposição a misturas complexas, além das diferenças encontradas entre metabolismos das espécies.

Este estudo obteve dados químicos e biológicos sobre áreas expostas às emissões dos veículos, mostrando associação entre hidrocarbonetos, metais e NO₂ com os níveis de danos no DNA observados nas células de sangue periférico do roedor nativo *C. minutus*. Nossos resultados estão de acordo com estudos sobre emissões, onde se observou pouco aumento de danos em roedores nativos expostos às emissões dos automóveis, sendo que o EC teve maior sensibilidade, demonstrando diferenças sazonais/temperatura, idade e sexo. O resultado negativo na avaliação de MN em eritrócitos do sangue periférico, teste estes que mede o dano não reparado no DNA, sugere que embora o EC tenha mostrado que as fêmeas adultas são as principais afetadas pelos poluentes aos quais estão expostas, os danos observados podem ser rapidamente reparados e/ou eliminados. Finalmente, a genotoxicidade *in vivo* das emissões dos veículos pode ser biomonitorada através do Ensaio Cometa versão alcalina. Entretanto, outros estudos ainda se fazem necessários para a melhor compreensão sobre o metabolismo de xenobióticos em *C. minutus*, e quais fatores específicos possam estar afetando os resultados da exposição às emissões.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

There is an ever-increasing number of chemicals present in our environment, many of which are capable of inducing adverse health effects in both animals and humans, representing an important cause of concern for its possible long-term effects on organisms health. The ecological impact and risks to organisms health associated with exposure to environmental pollutants are exceedingly difficult to evaluate because many of these are components of complex mixtures. In the cities, the automobiles are responsible for more than half of aerial pollution, since the gases produced from the internal combustion consist of thousands of separate hazardous compounds. The most commonly mentioned hazardous substances are nitrogen oxides (NO_x), carbon monoxide (CO), sulfur dioxide (SO₂), hydrocarbons (HC) and their derivatives, and inorganic compounds, including metals (cadmium, chromium, copper, nickel, vanadium, zinc and lead).

The present report is concerned with the application and verification of alkaline Comet assay (SCG) to *Ctenomys minutus* (a fossorial rodent) to detect the possible genotoxicity effects to automobile emissions and to compare the results with a Micronucleus (MN) assay, both in peripheral blood, besides to identify some agents involved and verify whether seasonal patterns exist. Considering other factors that could affect the results, identify some agents involved with vehicle exhaust, seasonal patterns, temperature, wind, and rodents' gender and age.

Automobile exhaust exposed *C. minutus* (Octodontidae-Rodentia), were captured at two different fields from both sides of RS/030, a highway, in the state of Rio Grande do Sul: (a) Amaral and (b) Weber. Reference animals, the external control, were obtained from Maribo field, about 3 km far from the other highway (RS/389), consequently far from vehicle emissions. By the end of this study time, 123 rodents (73 females and 50 males) had been live-trapped. The most important results and conclusions are presented below:

1) *C. minutus* permanently exposed to automobile emissions demonstrated no increase in micronucleated cells, but an increase in cells with levels of DNA, including a little seasonal variation, demonstrating the higher sensitivity of this test. These differences between tests can be explained by the biological mechanism where the spleen captures and destroys circulating micronucleated erythrocytes in some organisms (e.g. rats). This possibility in *C. minutus* can be reinforced by the difference observed for the mean frequency of young and

mature erythrocytes with MN, PCE and NCE, respectively. The smaller value for NCE than PCE with MN, by site, demonstrate that the micronucleated cells do not remain in the circulation;

2) significantly higher damage values for winter of 2000 than for other seasons at the three sites. The regression analysis concurred with earlier findings, which demonstrated a tendency to an inverse ratio between temperature and damage, but a significant correlation was not demonstrated;

3) the mean traffic during the summer was higher than in winter. Considering that airborne mutagens from emissions are soil mutagens, these compounds are possibly modified by microorganisms and microflora of soil. Thus, the rapid photochemical inactivation and reduced volatilization of airborne mutagens occur during winter, as well as increased deposition rates of vapor-phase mutagens on to particulate matter in air transported to surface. It can explain the relation between lower temperatures and more damaged cells of *C. minutus*, due to the fact that his habitat (fossorial), is in direct contact with soil;

4) NO₂ levels associated with vehicle exhausts were similar in both Weber and Amaral during all seasons. Maribo did not show the same association (NO₂ X traffic) due to its distance from the highway. The predominant force in pollution transport, including NO₂ is the wind, being downwind the predominant tendency for the pollutants. The predominant wind for the regions of this study is northeastern during the winter and northwestern in the summer. Thus, when geographic localization of the highway RS/030 is observed, it is possible to comprehend the NO₂ data which in the winter Weber showed larger values than Amaral, and in the summer the opposite. In spite of this result, the NO₂ annual average measured in Amaral showed less NO₂, higher DI and higher damage frequency than Weber. Although there was no significant difference between Amaral and Weber for NO₂, it was observed that the wind during the year was generally northwestern, thus turning Amaral the region downwind (directly exposed to emissions) and Weber, upwind. However, passive samplers may provide under- or overestimations of the cumulative exposure;

5) additional strong support for the hypothesis that Amaral field is more exposed to emissions due to predominant wind is observed when soil sample from this field presented Amaral as having a higher total concentration of hydrocarbons (5.5 ppb) than Weber (4.5 ppb) and Maribo (4.0 ppb). The similar concentration for Maribo and Weber can be explained due to the fact that not all hydrocarbons are the result of human activity. Once the photochemical reactions involving NO_x and O₃ are responsible for the transformation in some

toxic hydrocarbons, this may be the answer to Maribo (control) showing less DNA damage than Weber;

6) concentration of metals like chromium, copper, nickel and zinc in the soil from Weber and Amaral (Weber > Amaral) showed higher levels than the control, but it did not demonstrate similar distribution in the fields as hydrocarbons (Amaral > Weber). This difference can be explained due to hydrocarbons being transported through the atmosphere in the vapor phase and/or adsorbed on particulate matter, which also occur with the metals, but its distribution in soil, vegetation and the atmosphere is mainly along the highways. Cr, Cu, Ni and Zn, the principal metals observed in soil samples from Weber and Amaral were above Maribo levels. Cu and Zn are not generally weak mutagens in most of the traditional mammalian test systems; and Cr, among these observed metals, is the only one with strong mutagenic effects. The same authors suggest that metals induce DNA damage by the production of DNA single strand breaks, which are soon repaired;

7) adults and subadults were compared to demonstrate a possible relationship between age and damage. No significant difference between adults and subadults by MN assay was demonstrated. But the subadults from control study area (Maribo) presented twofold increase in the number of cells with DNA damage than adults. Some studies showed similar findings for many species, where young animals presented higher spontaneous damage values than adults, but others did not demonstrate any difference between subadults' and adults' spontaneous DNA damage. In spite of the different results for the same genera (*Ctenomys*), age-specific differences in metabolism are observed in certain strains of rodents. On the other hand, the differences between adults and subadults is not evident for Weber and Amaral groups due to the fact that both fields are exposed to pollutants;

8) about males and females, at both MN and comet assays, DNA damage measured were statistically similar, no significant gender difference was observed. Female adults from regions exposed to automobile exhaust presented significant response to pollutants. Thus, females showed higher rates of xenobiotic metabolism than males, which is more common due to female sex hormones. The same authors comment that sex-specific differences can produce a lower clearance of the chemical in the sex with the slower rate of metabolism, resulting in a prolonged half-life and higher blood concentration of the compound, which may cause toxicity. Conversely, if a toxic metabolite is produced by metabolism, the sex with the lower metabolic activity is less susceptible to the specific chemical-induced toxicity. In addition, these sex-dependent variations in metabolism by rodents may be the result of

differential evolution of isoforms of cytochromes P450 in mammals. The negative evaluation for the induction of MN in peripheral blood erythrocytes, demonstrated that although alkaline SCG results showed that adult females are the principal affected by air pollutants from vehicle emissions, this kind of damage may be quickly eliminated or repaired;

Some of the difficulties that faced biomonitoring have been to identify the individual compounds that may be responsible for possible adverse effects associated with exposure to environmental agents, besides difference between species and metabolism.

This study provided chemical and biological data from areas exposed to automobile exhaust, indicating the association among hydrocarbons, metals and NO₂ with levels of damaged cells observed in the wild rodent *C. minutus*. In conclusion, our results agree with previous data on engine exhaust and fuel components, mainly PAHs, where it was generally observed weak increase in damage for exposed native rodent to automobile emissions. Alkaline SCG showed more sensitivity, demonstrating seasonal/temperature differences and relationship to aging and gender. Finally, we believe that the *in vivo* genotoxicity of automobile exhausts can be biomonitored by the alkaline SCG. However, more studies are necessary to result in a better understanding about xenobiotic metabolism of *C. minutus* and how the specific factors affected the outcome of the emission exposure.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Ahmed A, Mahrous K, El-Sobhy H (1998): Cytogenetic study of buffalo under pollution of environmental conditions. *Mutation Research* 419: 21-26.
- Alexander RR, Alexander MA (1999): Genotoxicity of two polycyclic aromatic hydrocarbons declines as they age in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 18. No. 6. 1140-1143.
- APHA - American Public Health Association (1995): Standard methods for examination of Water and wastewater. No 16. Washington: 1268 p.
- Allen SE (1989): *Chemical Analysis of Ecological Materials*. 2.ed. London: Blackwell Scientific Publications, 368p.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)-ToxFAQs (2001): Toxicological profile for: chromium, nickel, copper and zinc, Online: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>, University of Utah.
- Auger J, Kustmann JM, Czyglik F, Jouannet P (1995): Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine* 332: 281-285.
- Baker RJ, Hamilton MJ, Bussche RAVD, Wiggins LE, Sugg DW, Smith MH, Lomakin MD, Gaschak SP, Bundova EG, Rudenskaya GA, Chesser RJ (1996): Small mammals from the most radioactive sites near the chornobyl nuclear power plant. *Journal of Mammalogy* 77: 155-170.
- Balch GC, Metcalfe CD, Reichert WL, Stein JE (1995): Biomarkers of exposure of brown bullheads to contaminants in Hamilton Harbour, Ontario. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* (Butterworth BE, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.). Plenum Press, New York, 249-273.
- Barale R, Zucconi D, Giorgelli F, Carducci AL, Tonelli M, Loprieno N (1989): Mutagenicity of airborne particles from a nonindustrial town in Italy. *Environmental Molecular Mutagenesis* 13: 227-233.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M (1998): Development and validation of the in vivo alkaline Comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research* 415: 167-184.
- Bickham, JW, Sandhu, S, Hebert, PDN, Chikhi, L & Athwal R (2000): Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463: 33-51.
- Bowen BW (1999): Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology* 8: 5-10.
- Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Piérard C, Garrigues P (1997): Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58: 85-97.

- Bünger J, Müller MM, Krahl J, Baum K, Weigel A, Hallier E, Schulz TG (2000): Mutagenicity of diesel particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis* 15: 391-397.
- Butterworth FM, Corkum L, Guzmán-Rincón J (1995): *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York. 1-8.
- Campbell JL, Hopman, TL, Maxwell JÁ, Nejedly Z (2000): Nuclear Instruments and Methods in Physics Research 170 B -193.
- Carere A, Antocia A, Cimini D, Crebelli R, Degraffi F, Leopardi P, Marcon F, Sgura A, Tanzarella C, Zijno A (1998): Genetic effects of petroleum fuels: II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32: 130-138.
- CETESB (1992): Relatório de Qualidade do ar no Estado de São Paulo (In Portuguese).
- CETESB (1996): Operação Caça Fumaça - Operação Rodízio - S.M.A.
- Colborn T (1994): The wildlife/human connection: modernizing risk decisions. *Environmental Health Perspectives* 102 (Suppl. 12): 55-59.
- Collins A, Ai-guo M, Duthie SJ (1995): The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research* 336: 69-77.
- Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N (1997): Comet assay in human biomonitoring studies: Reability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30:139-146.
- CSGMT - The Collaborative Study Group for the Micronucleus test (1992): Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS - MMS. *Mutation Research* 278: 83-98.
- Contreras, LC, Torres-Mura, JC, Yáñez, JL (1987) Biogeography of Octodontid Rodents: Na Eco-Evolutionary Hypotesis. *Fieldiana Zoology* 39: 401-411.
- Cotelle S, Féraud JF (1999); Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246-255.
- Crebelli R, Conti L, Crochi B, Carere A, Bertoldi C, Giacomo ND (1995): The effect of fuel composition on the mutagenicity of diesel engine exhaust. *Mutation Research* 346: 167-172.
- Delaney, PJV (1965): *Fisiografia e Geologia da Superfície da Planície Costeira do Rio grande do Sul*. Publicação especial, n. 6. 105p. Escola de geologia da UFRGS, Porto Alegre.
- De Marini DM (1998): Mutation spectra of complex mixtures. *Mutation Research* 411: 11-18.
- Edenharder R, Ortseifen M, Koch M, Wesp HF (2000): Soil mutagens are airborne mutagens: variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by organic extracts

- of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutation Research* 472: 23-36.
- EPA – Environmental Protection Agency (1994a): Air toxic from motor vehicles. August. Site: <http://www.cnie.org>
- EPA – Environmental Protection Agency (1994b): Office Research and Development. Health Risk Perspectives of Fuel Oxygenates. December. Site: <http://www.cnie.org>
- EPA – Environmental Protection Agency (1995): Implementation of the Reformulated Gasoline Program. August. Site: <http://www.cnie.org>
- Farbairn DW, Olive PL, O'Neil KL (1995): The Comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339: 37-59.
- Freedman B (1995): Toxic elements. In: Freedman B, editor. *Environmental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance and Other Stresses*. Canada: Dalhousie University, p 62-93.
- Freitas TRO (1997): Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae). *Revista Brasileira de Genética* 20: 1-7.
- Freitas TRO (1995): Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 30: 53-59.
- Freygang CC, Marinho JR, Freitas TRO (2000): Novo cariótipo e ampliação da distribuição geográfica de *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae) no sul do Brasil. *Genetics and Molecular Biology* 23: 34 p.
- Gattás GJF, Cardos LDA, Medrado-Faria MDA, Saldanha PH (2001): Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occup Med-Oxford* 51: 107-113.
- Gava, A (1996): Uma zona de hibridação em *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae): abordagem citogenética. Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS: Porto Alegre, 102p. (Dissertação de mestrado).
- Ghio AJ, Stonehuerner J, Pritchard RJ, Piantadosi CA, Quigley D, Dreher KL, Costa DL (1996): Humic-like substances in air pollution particulates correlate with concentrations in transition metals and oxidant generation. *Inhalation Toxicology* 8: 479-494.
- Goering PL (1995): Stress Proteins: Molecular Biomarkers of Chemical Exposure and Toxicity. *Biomarkers and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* (Butterworth, B E, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.) Plenum Press, New York, 217-227 p.
- Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R (1995): Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. In: *Application of Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures* (Sandhu S, Waters MD, eds.) Plenum Publishing Co., New York, 95-114 p.

- Guzmán-Rincón J, Graf U (1995): *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination teste as a biomonitor. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* (Butterworth, B E, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.) Plenum Press, New York, 217-227 p.
- Hadnagy W, Seemayer NH (1988): Cytotoxic and Genotoxic effects of extract of particulate emission from a gasoline-powered engine. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 12: 385-396.
- Hasenack H, Ferraro WL (1989): Considerações sobre o clima da região de Tramandaí, RS. In: UFRGS editor. *Pesquisas/ Instituto de Geociências*. Porto Alegre: UFRGS, p 53-70.
- Hartwing A, Schlegel R, Beyersmann D (1990): Indirect mechanism of lead induced genotoxicity in cultures mammalian cells. *Mutation Research* 241: 75-82.
- Hasspieler BM, Ali Pour M, Maffner GD, Adeli K (1995): Assessment of Cyto and gentoxicity of Environmental samples: Improved Methods Using Human and Fish Cell Lines. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* (Butterworth, B E, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.) Plenum Press, New York, 149-167p.
- Hayashi M, MacGregor JT, gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutou, S (2000): In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 234-252.
- He F (1993): Target preparation for trace element determination of biological materials using techniques. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 334: 238-245.
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavourim K, Macgregor JT, Newell, GW, Slamone MF (1983): The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Research* 123: 61-118.
- Hogsted B (1991): Gasoline pump machanics had increases frequencies and sizes of micronuclei in limphocytes stimulated by pokeweed mitogen. *Mutation Research* 263: 51-55.
- Holden HE, Majeska JB, Studwell D (1997): A direct comparison of mouse and rat bone marrow and blood as target tissues in the Micronucleus assay. *Mutation Research* 391: 87-89.
- Huang XD, Dixon DG, Greenberg, BM (1995): Increased polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity following their photomodification in natural sunlight: impacts on the duckweed *Lemna gibba* L. G-3, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 32, 194.
- Huisingh JL (1980) Short-term carcinogenesis and mutagenesis bioassays of mobile-source emissions. In: Waters MD, Sandhu SS, Husingh JL, Claxton L, editors. *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures II*. New York: Plenum, p 269-275.
- IARC - International Agency for Research on Cancer (1989) Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. In: *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans*. Lyon, 46.

- Johnson BL (1993): Neurobehavioral toxicity in the 21st century: A future or a failure? *Environmental Research* 62: 114-124.
- Knoll, GF (1989): *Radiation Detection and Measurement*, Second Edition, John Wiley & Sons.
- Krupa SV, Legge AH (2000): Passive sampling of ambient, gaseous air pollutants: an assessment from an ecological perspective. *Environmental Pollution* 107:31-45.
- Kyrtopoulos SA, Georgiadis P, Autrup H, Desmopoulos N, Farmer P, Haugen A, Katsauyanni K, Lambert B, Ovrebo S, Sram R, Stefanou G, Topinka J (2001): Biomarkers of genotoxicity of urban air pollution – Overview and descriptive data from a molecular epidemiology study on populations exposed to moderate-to-low level of polycyclic aromatic hydrocarbons: the AULIS project. *Mutation Research* 496: 207-228.
- Lemos M, Linchtenfels AJFC, Amaro E (1994): Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environmental Research* 66: 87-95.
- Lessa EP, Cook JA (1998): The molecular phylogenetics of Tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggest an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 88-89.
- Ma T-H (1995): *Tradescantia* (spiderwort) plants as biomonitors of the genotoxicity of environmental pollutants. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* (Butterworth, B E, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.) Plenum Press, New York, 207-216 p.
- Mage DT, Zali O (1992): *Motor Vehicle Air Pollution: Public Health Impact and Control Measures*, Doc. WHO/PEP/92.4, Geneva.
- MEC - Ministério da Educação e Cultura (2001): *Educação ambiental*. Site: <http://www.mec.gov.br/self/ambiental/default.shtm>
- Miller B, Pötter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S (1997): Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro Micronucleus test. *Mutation Research* 410: 81-116.
- Missini S, Lombi E (1997): Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments, *Mutation Research* 393: 17-21.
- Moore MJ, Miller CA, Weisbrod AV, Shea D, Hamilton PK, Kraus SD, Rowntree VJ, Patenaude N, Stegeman JJ (1998): Cytochrome P450 1A and chemical contaminants in dermal biopsies of northern and southern right whales. *Special Meeting of International Scientific Commission of Whale M98/RW24*: 1-13.
- Moriske H-J, Schöndube M; Menk G; Seifert B (1996): Erfassung von NO₂-Konzentrationen in der Außenluft mittels Passivsammlern nach Palmes. 1. Mitteilung: Laborversuche und Qualitätssicherung. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 56: 129-132.

- Moriske H-J, Schöndube M (1998): Use of passive samplers for measuring nitrogen dioxide in developing and developed countries. Proceedings. 11th World Clean Air and Environment Congress, Durban Chapter 7B-4.
- Mugford CA, Kedderis GL (1998): Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drog Metabolism Reviews* 30: 441-498.
- Palmes ED, Burton Jr RM, Ravishankar K, Solomon J J (1986): A simple mathematical model for diffusional sampler operation. *American Industry and Hygiene Association Journal* 47: 418-420.
- Peirce JJ, Weiner RF, Vesilind PA (1998): Meteorology and Air Pollution. In: *Environmental Pollution and Control*. 4th edition, p. 125-135.
- Pereira-Neto AD, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS, Barek J (2000): Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): Uma revisão metodológica. *Química Nova* 23: 765-773.
- Petras M, Vrzog M, pandrangi R, Ralph S, Perry K (1995): Biological monitoring of environmental genotoxicity in southwestern Ontario. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* (Butterworth, B E, Corkum LD, Guzmán-Rincón J, eds.) Plenum Press, New York, 115-137 p.
- Rabl A, Spadaro JV (1999): Damages and costs of air pollution: an analysis of uncertainties. *Environmental International* 5: 29-46.
- Reig OA, Bush C, Ortells MO, Contreras JR (1990): An overview of evolution, systematic, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. In Nevo, E., and Reig, O.A. (eds.), *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Level*. Alan R. Liss, New York, 71-96 p.
- Reymão MSF, Cury, PMP, Lichtenfels AJFC (1997): Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environmental Research* 74: 150-158.
- Restani P, Galli CL (1991): Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. *Criteria Toxicology* 21: 315-328.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P (1999): Are metals dietary carcinogens? *Mutation Research* 443: 157-181.
- Saldiva PHN, Böhm GM (1998): Animal Indicators of Adverse Effects Associated with Air Pollution. *Ecosystem Health*. Vol. 4. No. 4. December.
- Santos-Mello R, Cavalcante B (1992): Cytogenetic studies on gas station attendants. *Mutation Research* 280: 285-290.
- Schegel R, McGregor JT (1984): The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fisher 344 rats: Implications for cytogenetic screening. *Mutation Research* 127: 169-174.

- Schwarzbald A.; Schafer A (1984): Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul - Brasil. *Amazoniana*, 9: 87-104.
- Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B (2000a): Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental in vivo biomonitoring with native rodents. *Genetic and Molecular Biology* 23: 241-245.
- Silva J, Freitas TRO, Heuser V, Marinho JR, Bittencourt F, Cerski CTS, Kliemann LM, Erdtmann B (2000b): Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutation* 470: 39-51.
- Silva J, Freitas TRO, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B (2000c): Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 270-278.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988): A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim Cell Research* 175: 184-191.
- Strahler NA (1977): *Geografia Física*. Barcelona: Omega, 767 p.
- Srám RJ, Holá N, Kotesovec F, V'Ávra R (1985): Chromosomal abnormalities in soft coal open-cast mining workers. *Mutation Research* 144: 271-275.
- Srám RJ, Benes I, Binková B, Dejmeč J, Horstman D, Kotesovec F, Otto D, Perreault SD, Rubes J, Selevan SG, Skalík I, Steves RK, Lewtas J (1996): Teplice program - The impact of air pollution on human health. *Environmental Health Perspectives* 104: 699-714.
- Talmage SS, Walton BT (1991); Small Mammals as Monitors of Environmental Contaminants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 119: 47-145.
- Tice RR, Ormiston BG, Boucher R, Luke CA, Paquette DS (1988): Environmental biomonitoring with feral rodent species. In: *Application of Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures* (Sandhu S, Water MD, eds.) Plenum Publishing Co., New York, 175-180 p.
- Tice RR, Erexson GL, Hilliard CJ, Huston JL, Boehn RM, Gulati D, Shelby MD (1990): Effect of treatment protocol and sample time on the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutagenesis* 5: 313-321.
- Tice RR (1995): The single cell gel comet assay: a microgel eletrophoretic technique for detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venit S., editors. *Environmental Mutagenesis*: Oxford: Bios Scientific Publishers, p 315-339.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki YF (2000): Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221.

- Valberg PA, Crouch EAC (1999): Meta-analysis of rat tumors from lifetime inhalation of diesel exhaust. *Environmental Health Perspectives*, 107: 693-699.
- Villwock JÁ (1984): Geology of the coastal province of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. A synthesis. *Porto Alegre. Pesquisas*, 16: 5-49.
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997): Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277: 494-499.
- Waechter JL (1985): Aspectos ecológicos da vegetação da restinga no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, PUCRS. *Comunicações do Museu, Série Botânica*, 33: 49-58.
- Wesp HF, Tang X, Edenharder R (2000): The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soil: contamination with, fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in the Salmonella/reversion assay and effects of solvent fractions on the sister-chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and in the vivo mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutation Research* 472: 1-21
- Wilks BJ (1963): Some aspects of ecology and population dynamics of the pocket gopher (*Geomys bursarius*) in southern Texas. *Tex J Sci* 15: 241-283.
- Winder C, Bonin T (1993): The genotoxicity of lead. *Mutation Research* 285: 117-124.
- Woods, CA (1993): Suborder Hystricognathi. In: *Mammals Species of the World*. Ed. Smithsonian Institution Press. 1207p.
- Yanagisawa Y (1993): Determination of nitrogen dioxide by means of the Palmes diffusion tube and the Yanagisawa filter badge. In: *Environmental Carcinogens. Methods of Analysis and Exposure Measurement*. Ed. Seifert, B., Van der Wiel, H.J., Dodet, B., O'Neill, I, K. IARC Scientific Publications No. 109, Lyon: 256-268.
- Yu M-H (2001): *Environmental Toxicology: Impacts of environmental toxicant on living systems*. Boca Raton: Lewis Publishers, 255 p.
- Zitko V, Stenson G, Hellou J (1998): Levels of organochlorine and polycyclic aromatic compounds in harp seal bladders (*Phoca groenlandica*). *The Science of the Total Environment*. 221: 11-29.
- Zmirou D, Deloraine A, Balducci F, Boudet C, Dechenaux J (1999): Health effects costs of particulated air pollution. *Journal Occupation Environmental Medicine* 41: 847-856.
- Zuninga-González G, Torres-Bugarín O, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ventura-Aguiar AJ, Ramos-Mora A, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Gallegos-Arreola MP (2001a): Variation of Micronucleated Erythrocytes in Peripheral Blood of *Sciurus aureogaster* in Relation to Age: An Increment of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes after the administration of colchicine. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37: 173-177.
- Zuninga-González G, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Martínez-González S, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Ramos-Mora A, Ontiveros-Lira D,

Gallegos-Arreola MP (2001b): Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including human spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research* 494: 161-167.