

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**TOXICIDADE GENÉTICA ASSOCIADA À REGIÃO  
HIDROGRÁFICA DO GUAÍBA ATRAVÉS DE BIOENSAIOS DE  
CURTA DURAÇÃO**

**Viviane Souza do Amaral**

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

**Orientadora: Dra. Heloisa Helena Rodrigues de Andrade**

**Porto Alegre**

**02/2005**

Esta Tese eu dedico à memória dos meus avós Eva e Emílio.

Poderá passar cem anos, jamais esquecerei de vocês. A cada dia o meu amor fica mais forte. Vocês representam toda a ternura que tenho no meu coração. Amo vocês.

## Agradecimentos

---

A Deus,

Pela eterna vigilância e proteção.

Ter fé é ter esperança.

Helô,

Certa vez, em uma daquelas nossas conversas, eu mencionei que três pessoas foram as principais responsáveis pela minha formação: minha mãe, meu pai e você.

Durante a nossa vida elegemos modelos a serem seguidos. Quando eu tinha 21 anos tive a oportunidade de conhecer uma mulher que seria o meu exemplo – você. O que me ensinastes, ao longo destes anos, ultrapassou as fronteiras da ciência, foi além da relação orientador-orientado - a lição mais importante que aprendi foi a da amizade.

O amor que sinto por ti é como de filha - incondicional. Mesmo quando a nossa relação atravessa momentos turbulentos, o sentimento que sempre prevalece é o amor. E como dizia o poeta, sem amor eu nada seria.....

Biba,

Obrigada.

Obrigada por ter estendido a mão sobre os meus ombros quando eu precisei. Obrigada pela paciência que tens comigo. Obrigada pela ajuda com a bibliografia – sempre impecável. Ao longo destes anos pude conhecer a pessoa maravilhosa que tu és, uma mãezona para todos nós. A tua presença é imprescindível nesta equipe. Obrigada.

Meg,

A amizade nem sempre vem acompanhada de momentos agradáveis, as vezes ela necessita de obstáculos para se manter forte. Sempre quando te chamei a atenção era com o intuito de te ajudar. Desculpa pelo meu jeito torto de ajudar, mas foi de coração. Apesar das dificuldades que a gente passou juntas, sei que tu és uma amiga que eu posso contar de tudo e que nunca irás me julgar. Durante estes cinco anos de convivência pude aprender muito contigo. Tu me ensinaste que mesmo nos piores momentos da vida nós podemos nos erguer do chão e começar do zero. Obrigada pelo companheirismo dentro e fora do trabalho. Não olhe para trás - apenas começamos. O mundo começa agora. Te adoro.

Rafa,

Meu irmão de coração! Os laços de sangue não estabelecem, necessariamente, os laços entre os Espíritos. Os verdadeiros laços de família não são, pois, os da consangüinidade, mas os da simpatia e da comunhão de pensamentos que unem as pessoas. Obrigada por sempre me ouvir quando eu precisei, por estar sempre do meu lado, por me fazer rir quando tudo que eu queria era chorar. Te desejo todo o sucesso que alguém possa alcançar. Meu amigo, não desista nunca dos teus sonhos, por mais que eles pareçam distantes. Nunca deixe de acreditar no teu trabalho. E quando tiveres passando por dificuldades, lembre-se sempre de mim, pois onde eu estiver eu irei te ajudar (nem que seja por mail). Obrigada por me ajudares sempre quando eu precisei. Jamais me esquecerei das nossas tardes fazendo estoque, totalmente eterizados, só no deixa a vida nos levar. Valeu, te adoro!

Aos meus pais,

Chega ao fim mais uma etapa das nossas vidas. Assim como eu disse que o diploma de graduação era nosso, digo a vocês que esta tese é nossa também. Obrigado por cuidarem de mim, mesmo quando eu me faço de difícil, no papel de mulher independente. Vocês além de me darem os seus genes me deram amor. Desculpem esta filha que as vezes parece distante, mas é que a corrida pela vida acaba nos tornando distantes. A gana que tenho em chegar a algum lugar é por vocês, pois eu quero retribuir tudo o que fizeram por mim, e ainda assim, será pouco. Amo vocês.

Aos meus irmãos,

Júnior, apesar das nossas diferenças eu te amo muito. Obrigada por ter colocado no mundo duas crianças maravilhosas que me fazem tão feliz – Matheus e Fernanda. Quero que tu saibas que eu os amo como se fossem meus filhos. Conte comigo eternamente.....

Gabriel e Lucas, a mana ama vocês. Apesar de nem sempre estar por perto, eu me importo muito com vocês. Vocês estão guardadinhos no meu coração. Obrigada por sempre estarem com os braços abertos.....

À Dona Alix e seu Luís,

Obrigada, por terem me acolhido como uma neta. Tenho muito carinho e respeito por vocês.

Aos meus AMIGOS: Helô, Biba, Meg, Rafa, Vani, Cíntia, Cibele, Taís, Cíntia (Bio), Marcele, Renata, Magda, Fábio, Aninha, Fabiano, Simone, Maurício, Fernanda, Vander e Kênya, dedico este poema...

**Escolha...**

Escolho os meus amigos não pela pele nem outro arquétipo qualquer, mas pela pupila.

Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante.

A mim não interessam os bons de espírito ou os maus de hábitos.

Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo.

Deles não quero resposta, quero o meu avesso.

Que me tragam dúvidas e angústias e agüentem o que há de pior em mim.

Para isso, só sendo louco.

Escolho meus amigos pela cara lavada e pela alma exposta.

Não quero só o ombro ou colo, quero também sua maior alegria.

Amigo que não ri junto não sabe sofrer junto.

Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade.

Não quero risos previsíveis nem choros piedosos.

Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça.

Não quero amigos adultos nem chatos.

Quero-os metade infância e a outra metade velhice.

Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto e velhos para que nunca tenham pressa. Tenho amigos para saber quem eu sou.

Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril.

(Oscar Wilde)

Esta tese não poderia ser realizada sem a ajuda fundamental de algumas pessoas, portanto não poderia deixar de agradecer:

Aos profissionais da SESMA/COPESUL, pelo auxílio inestimável na coleta das amostras.

À equipe dos laboratórios de Mutagênese da UFRGS e do TOXIGEN (ULBRA) pela imprescindível ajuda na parte final deste trabalho, destacando os colegas Leandro, Pollyanna, Guilherme, Carol, Meg e Paula.

À Alessandra Peres que encarou o desafio de me auxiliar no estabelecimento da técnica de micronúcleos em cultura de células. Ale que bom que tu és tão louca quanto eu, porque não foi fácil. Lembra aquelas tardes cheirando ácido acético? Mas o que importa é que valeu a pena! Ainda estão esperando que a gente vá correr sem roupa pela passarela da PUC, pra pagar a promessa! Muito Obrigada pela ajuda.

À Nicole e ao Ilan, pelo imensurável auxílio nas culturas e no preparo das lâminas. Espero que isto tenha servido de lição pra vocês, que estão começando na vida acadêmica, mostrando que com fé e perseverança a gente chega lá! Beijinhos, obrigadão!

À Marisa e ao Andrés pela valiosa ajuda com o a coloração das lâminas. Obrigada de coração.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular da PUCRS por me acolher e por possibilitar que eu trabalhasse com cultura de células.

Ao Christian, por ter me recebido de forma tão carinhosa na PUCRS. Continue sendo assim tão querido, valeu!

A todas as pessoas que doaram sangue para a realização dos meus experimentos em especial a Ale e a Flavinha. Sem vocês nada disso poderia ser feito. Obrigada pela boa vontade.

As funcionárias do setor de coleta de sangue do hospital da PUCRS que sempre nos auxiliaram com a maior boa vontade, em especial a Raquel.

Ao Elmo J. A Cardoso, pela paciência, disponibilidade e amizade ao longo de todo o curso de pós-graduação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

E como não podia de ser eu vou agradecer a uma grande companheira que inclusive agora está aqui deitada em cima dos meus pertences – Belinha. Eu concordo plenamente com o gênio Leonardo da Vinci quando disse que “o menor de todos os felinos é uma obra de arte”.



Venha, meu coração está com pressa  
Quando a esperança está dispersa  
Só a verdade me liberta  
Chega de maldade e ilusão.

Venha, o amor tem sempre a porta aberta  
E vem chegando a primavera -  
Nosso futuro recomeça:  
Venha, que o que vem é perfeição.  
(Renato Russo)

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

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Capítulo I: Introdução Geral</b> .....	<b>9</b>
1.2. Bioensaios Utilizados .....	<b>15</b>
1.3. Caracterização do Local de Estudo – Região Hidrográfica do Guaíba.....	22
1.3.1. Bacia do Guaíba.....	23
1.3.2. Bacia do Gravataí.....	24
1.3.3. Bacia do Sinos.....	25
1.3.4. Bacia do Caí.....	25
1.3.5. Bacia do Taquari-Antas.....	26
1.3.6. Bacia do Alto Jacuí.....	26
1.3.7. Bacia do Vacacaí – Vacacaí Mirim.....	27
1.3.8. Bacia do Pardo/Baixo Jacuí.....	27
1.3.9. Avaliação da Genotoxicidade.....	28
1.4. O Teste SMART.....	31
1.5. O Teste CBMN.....	33
1.6. Objetivos.....	36
<b>Capítulo II: Genetic Toxicity In Surface Water From Guaíba Hydrographic Region Under The Influence Of Industrial, Urban And Agricultural Sewage In The Drosophila Wing-Spot Test</b> .....	<b>37</b>
<b>Capítulo III: Micronuclei Induced By Surface Water From Guaíba Hydrographic Region Using The Cytokinesis-Block Assay</b> .....	<b>67</b>
<b>Capítulo IV: Discussão Geral</b> .....	<b>87</b>
4.1. Diagnóstico da Toxicidade Genética .....	88

4.1.2. Teste SMART .....	89
4.1.3. Teste CBMN .....	93
4.1.4. Comparação da Eficiência dos Testes – SMART e CBMN .....	95
Capítulo V: <b>Bibliografia Geral</b> .....	101

## Resumo

---

O presente estudo está centrado na avaliação de amostras de água superficial coletadas em 8 pontos distribuídos na Região Hidrográfica do Guaíba que sofrem influência de atividade agrícola, urbana e/ou industrial. Foram realizadas 4 coletas, representativas das quatro estações do ano: setembro de 2000, agosto de 2001, fevereiro de 2002 e maio de 2003. Tais amostras foram avaliadas através do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Mitótica (SMART) em *Drosophila melanogaster* e do Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (CBMN) em cultura de linfócitos humanos. Ao mesmo tempo procurou-se correlacionar os dados obtidos com o Teste CBMN com os observados no SMART, na busca de estabelecer o provável mecanismo de ação das genotoxinas presentes nos rios que constituem esta grande área.

Os dados obtidos a partir do emprego destas duas metodologias caracterizaram os rios Caí, Jacuí, Taquari, Sinos, Gravataí, Lago Guaíba, na Ponta da Cadeia (GPC) e Arroio Dilúvio, como indutores de toxicidade genética. Estes achados sugerem que, nas condições experimentais aplicadas, os poluentes ambientais induzem uma pluralidade de lesões no material genético das células somáticas, relacionadas com: mutação gênica e recombinação - detectada pelo SMART e/ou mutação cromossômica também diagnosticada pelo CBMN.

O conjunto destes dados demonstra que cerca de 50% das amostras testadas (16/32) foram genotóxicas em um ou em ambos os testes. Além disso, o maior número de respostas positivas (4/19) foi observado nas águas provenientes do GPC e do Caí, seguido pelos rios Jacuí e Taquari (3/19), rio dos Sinos e Arroio Dilúvio (2/19), e rio Gravataí (1/19). Na verdade, a análise comparativa dos resultados, demonstrou que o ensaio CBMN foi mais sensível para a detecção de genotoxinas de origem ambiental, já que das 11 amostras classificadas como indutoras de

eventos clastogênicos e aneugênicos neste teste somente 3 - Jacuí e Caí (Setembro de 2000), assim como GPC (Fevereiro de 2002) – foram diagnosticadas como positivas no SMART. Entretanto, justifica-se a inclusão do SMART na investigação de amostras ambientais em função deste teste privilegiar a detecção de um parâmetro genético ainda pouco considerado, mas que têm um papel crucial nos eventos relacionados com a carcinogênese – a recombinação homóloga.

Desta forma, os dados obtidos através dos ensaios SMART e CBMN podem servir como um alerta relativo ao risco imposto pelas águas da Região Hidrográfica do Guaíba – o que compromete o abastecimento de água potável para mais de um milhão de pessoas. De fato, os principais impactos ambientais no Lago Guaíba são *(i)* o escoamento de esgotos domésticos de Porto Alegre; *(ii)* as águas contaminadas, principalmente, dos rios Gravataí e Sinos que desembocam no lago; *(iii)* efluentes provenientes das indústrias de produtos alimentares, metalurgia e celulose, localizadas nas suas margens; e *(iv)* grandes lançamentos de dejetos urbanos não tratados provenientes das águas do Arroio Dilúvio.

## Abstract

---

The present study is focused on the assessment of surface water samples collected in 8 different sampling sites along the Guaíba Hydrographic Region. The waters analysed suffer the influence of agricultural, urban and/or industrial activities. Four sample collections were carried out, representative of the four seasons of the year: September 2000, August 2001, February 2002, and May 2003. All samples were analysed by the Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster* and by the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (CBMN) in human lymphocyte cultures. Concomitantly, an attempt was made to correlate the CBMN assay data with SMART results with a view to establishing the likely action mechanism of the genotoxins present in the rivers forming that large hydrographic region.

The data obtained by the two methodologies have characterised the waters of rivers Caí, Jacuí, Taquari, Sinos, Gravataí, as well as Lake Guaíba at the Ponta da Cadeia location (GPC) and Dilúvio Brook, as inducers of genetic toxicity. These findings suggest that under the experimental conditions applied, environment pollutants induce a variety of lesions in the genetic material of somatic cells. These lesions are related to: gene mutation and/or recombination – detected by SMART, and/or chromosomal mutation also diagnosed by CBMN.

This set of data demonstrates that around 50% of the samples analysed (16/32) were genotoxic in one or both assays. Besides, the greatest number of positive responses (4/19) was observed for waters from GPC and Caí, followed by rivers Jacuí and Taquari (3/19), Sinos and Dilúvio Brook (2/19), and river Gravataí (1/19). In fact, the comparative analysis of the results has shown the CBMN assay to be the most sensitive to detect genotoxins present in the environment, inasmuch as out of the 11 samples ranked as inducers of clastogenic and aneugenic events in CBMN, only 3 –

Jacuí and Caí (September 2000) and GPC (February 2002) – were diagnosed positive in SMART. Yet, the adoption of SMART in the investigation of environment samples is justified, as the assay is able to detect a still underrated genetic parameter, which nevertheless plays a crucial role in carcinogenesis-related events: homologous recombination.

Thus, the data obtained in the SMART and CBMN assays may be useful as an alert signal against the risk posed by the pollution of the Guaíba Lake Hydrographic Region – which jeopardises the supplies of drinking water to over one million people. Indeed, the main environment impacts against Lake Guaíba are: *(i)* the discharge of domestic sewage from the city of Porto Alegre; *(ii)* the contaminated waters chiefly from the Gravataí and Sinos rivers that flow into the lake; *(iii)* effluents from food, metallurgic, and cellulose industries based on the watercourses' banks; and *(iv)* large non-treated urban waste discharges transported by Dilúvio Brook waters.



---

## Capítulo I

---

# Introdução Geral

---

# 1. Introdução

---

A demanda por água de boa qualidade é um dos maiores desafios da atualidade. O crescimento urbano acelerado - representado por intenso êxodo rural e assentamento desordenado - a maior necessidade de alimentos e a conseqüente intensificação das atividades rurais - com consumo de cerca de 69% da água de boa qualidade para irrigação - assim como a industrialização e a decorrente liberação de dejetos não tratados nos corpos d'água são inquestionavelmente os maiores responsáveis pela poluição dos recursos hídricos (Nebel e Wright, 2000; Grassi, 2001).

Mais do que garantir a quantidade de água disponível é imprescindível avaliar a qualidade destas fontes hídricas - o que leva as agências de controle ambiental a recomendar o emprego de testes de natureza biológica, química e física para a identificação de agentes tóxicos presentes nos ecossistemas aquáticos. Uma série de estudos de toxicidade celular e genética de amostras ambientais demonstra que a exposição, em longo prazo, a genotoxinas impõe sérios riscos às populações que habitam os ecossistemas comprometidos. Estes poluentes podem alterar a constituição genética da população através da ação direta do agente tóxico com o material genético - efeitos genotóxicos - ou indireta, afetando tanto a fisiologia do organismo - efeitos fisiológicos - quanto modificando o ambiente no qual estes indivíduos residem - efeitos ecológicos. Tais contaminantes podem desencadear uma cascata de respostas, que inclui alterações: *(i)* em células germinativas e somáticas - associadas a doenças genéticas (Karsten e Krypsin-Sorensen, 1988; Kirkwood, 1989; Bridges *et al.*, 1990; Fearon e Vogelstein, 1990); *(ii)* nas freqüências alélicas; *(iii)* no sucesso reprodutivo e *(iv)* no tamanho populacional (Bickham *et al.*, 2000; De Wolf *et al.*, 2004) (Figura 1).

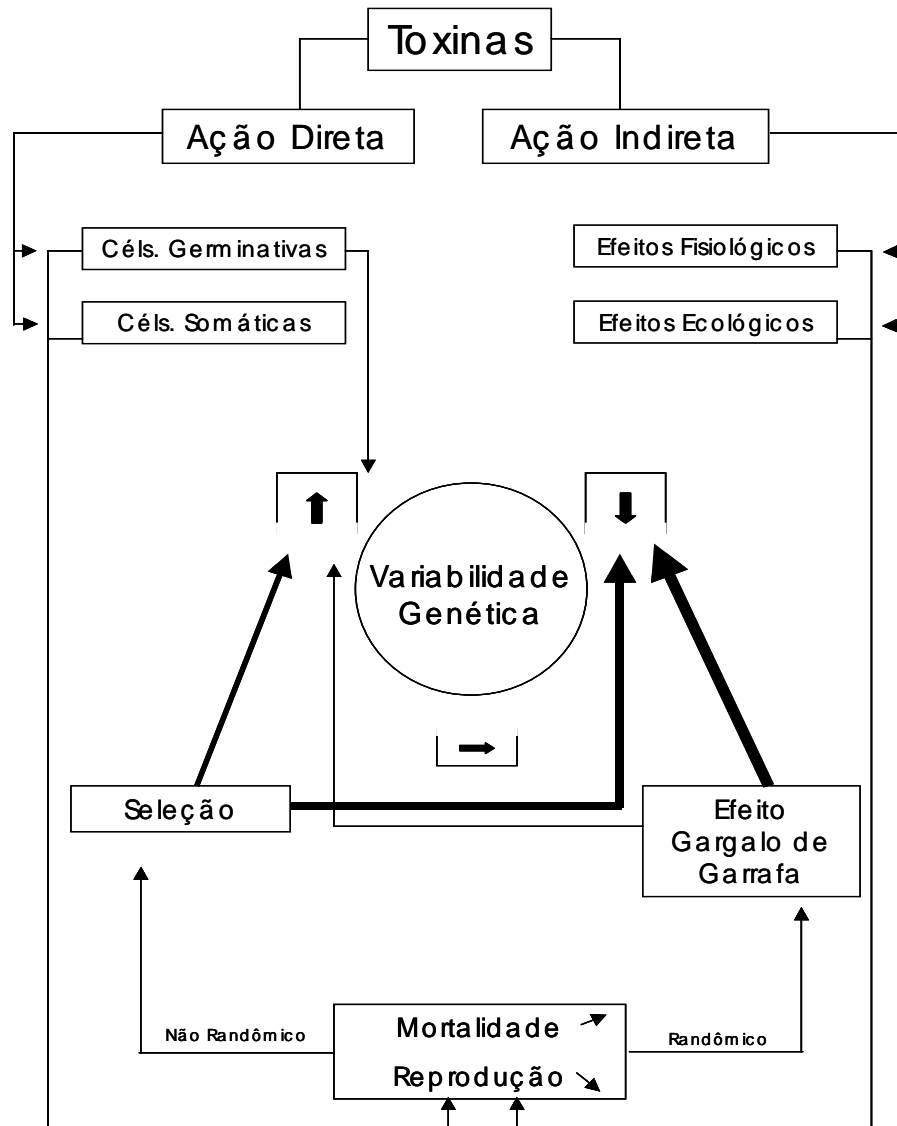


Fig. 1: Modelo que ilustra as principais rotas pelas quais as toxinas afetam a estrutura genética das populações. As alterações genéticas podem levar a aumento (↑), decréscimo (↓) ou efeito nulo na variabilidade genética das populações (→). A intensidade das setas é um indicativo da probabilidade de ocorrência dos eventos (setas diagonais representam aumentos ou decréscimos) (De Wolf *et al.*, 2004).

Entretanto, a extensão destes efeitos não é apenas determinada pelas toxinas presentes no ambiente, mas depende tanto da concentração demográfica da população e do potencial de adaptação a situações de estresse quanto de outras condições externas – podendo em conjunto determinar o destino de uma população (De Wolf *et al.*, 2004). Como conseqüência, as estratégias utilizadas pelas entidades de controle ambiental buscam o emprego de uma bateria de testes biológicos, composta por diversos ensaios, selecionados para detalhar a ação tóxica genética de uma determinada amostra. De fato, estudos recentes - utilizando diferentes bioensaios - revelam que as águas dos rios, de diversos países, vêm sendo constantemente contaminadas por uma gama de genotoxinas provenientes das descargas de origem antropogênica (Kataoka *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2002; Carabias-Martinez *et al.*, 2003). Estima-se que os compostos genotóxicos constituem pelo menos 5% dos poluentes derivados da ação antrópica em qualquer ecossistema (Rajaguru *et al.*, 2001).

Dentre as mais diversas fontes de toxinas produzidas industrialmente, destacam-se os compostos orgânicos sintéticos que são gerados em escala anual de milhões de toneladas durante a produção de plásticos, fibras, borrachas sintéticas, solventes e pesticidas. Uma classe preocupante destes compostos, do ponto de vista do impacto ambiental, é a dos hidrocarbonetos halogenados. Estas substâncias são basicamente poluentes aquáticos, cujos efeitos sobre os organismos permanecem ainda parcialmente conhecidos, particularmente no que se refere a exposições prolongadas, em baixas concentrações - disfunções renais e hepáticas, esterilidade, assim como alterações de natureza fisiológica, especialmente neurológicas são algumas das conseqüências associadas aos hidrocarbonetos halogenados (Grassi, 2001).

Também os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) assim como seus derivados nitrados e oxigenados, têm ampla distribuição - sendo encontrados em todos os compartimentos ambientais (Pereira Netto *et al.*, 2000). Dentre as inúmeras fontes relacionadas a sua produção, destacam-se os processos de combustão de material orgânico (particularmente a exaustão de motores a diesel ou a gasolina), a queima de carvão, as fotocopiadoras, a incineração de rejeitos, a fumaça do cigarro além da produção de alumínio e a gaseificação do coque (Pereira Netto *et al.*, 2000). Vários componentes deste grupo são capazes de reagir direta ou indiretamente com o DNA, sendo amplamente caracterizados como eficientes mutágenos e carcinógenos (Josephy *et al.*, 1997; Yu, 2001).

Outra classe de substâncias químicas não degradáveis no ambiente, com capacidade de bioacumulação, é a dos metais pesados, especialmente chumbo, mercúrio, arsênico, cádmio, estanho, cromo, zinco e cobre - amplamente utilizados na indústria, particularmente na laminação de metais, embora estejam também presentes em determinados pesticidas, pigmentos, esmaltes, tintas, corantes e até mesmo em medicamentos. Em virtude deste vasto espectro de distribuição, os metais aportam em sistemas aquáticos através de várias fontes (Manahan, 1997), contaminando os ambientes com a sua inerente ação genotóxica (Johnson, 1988; Bolognesi *et al.*, 1999; Sanchez-Galan *et al.*, 2001; Guecheva *et al.*, 2001; Gordon e Bowser, 2003; De Boeck *et al.*, 2003) - decorrente de dois mecanismos predominantes, a geração de danos oxidativos e a interferência com o reparo e a replicação do DNA (Reid *et al.*, 1994; Hartwig, 1995; Porter *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1998; Kasprzak *et al.*, 1999). A maioria dos metais com potencial carcinogênico provoca aumento dos efeitos citotóxico e mutagênico em sistemas bacterianos e em células de mamíferos quando em combinação com diferentes tipos de agentes que danificam o DNA (Snow, 1992; Rossman,

1995). No caso de Arsênico (III), Níquel (II), Cádmiio (II) Cobalto (II), Cromo (VI) e Chumbo (II) estes efeitos estão diretamente relacionados com a interação no processo de reparo do DNA e com o aumento na frequência de recombinação homóloga em células de mamíferos - parâmetro de essencial importância na gênese de neoplasias (Hartwig, 1995; Kasprzak *et al.*, 1999; Helleday *et al.*, 2000).

Adicionalmente, a agricultura contribui significativamente para o impacto ambiental dos ecossistemas aquáticos, através do uso de pesticidas nas lavouras. Estes compostos não apenas alteram a composição e a qualidade dos solos como, inevitavelmente, acabam por comprometer os corpos d'água adjacentes, expondo perigosamente os ecossistemas a diferentes contaminantes, muitos dos quais com propriedades genotóxicas (Ralph e Petras, 1998; Kaya *et al.*, 2000; Bolognesi e Morasso, 2000). De fato, a intoxicação por resíduos de pesticidas não é apenas uma das principais causas de mudanças nos ambientes naturais (Kendall, 1992), como também um risco para as populações humanas - uma vez que pode causar uma ampla gama de desordens que incluem desde alterações no sistema nervoso central (Mearns *et al.*, 1994), até indução de tumores malignos (Osaba *et al.*, 1999).

Os resíduos lançados pelos centros urbanos apresentam uma natureza ainda mais complexa, já que são formados pelo somatório de dejetos de origem doméstica associados aos de indústrias de pequeno porte. Desta forma, a sua constituição vai depender tanto do número de habitantes, como da quantidade e tipo de pequenas indústrias presentes no município, fazendo com que cada um apresente efluentes de composições distintas e particulares. Outro ponto a ser considerado é a presença ou não de algum tipo de tratamento, não só dos esgotos domésticos, mas também dos resíduos industriais, antes de seu despejo final nos corpos d'água. De fato, na grande maioria das vezes, indústrias

de pequeno porte não apresentam qualquer estratégia de tratamento de seus efluentes, enquanto que, dependendo do centro urbano, dejetos domésticos podem estar sujeitos a diferentes estratégias, que vão desde a sua total recuperação até seu lançamento direto nos sistemas aquáticos (White e Rasmussen, 1998). A idéia de que dejetos de origem industrial e/ou rural impõe um maior risco, quando comparados àqueles de origem municipal, tem sido enfatizada em diversos estudos sobre a genotoxicidade de amostras ambientais. No entanto, à medida que novos dados são obtidos, torna-se cada vez mais claro que a maior contribuição para a carga genotóxica total, imposta aos ecossistemas, deriva, principalmente, de dejetos urbanos (White *et al.*, 1996; White e Rasmussen, 1998). Mesmo assim, os resultados dos diversos estudos de amostras ambientais que sofrem influência urbana, costumam ser muito variados e, algumas vezes, contraditórios.

Coletivamente, esta gama de compostos com potencial tóxico e/ou genotóxico interage entre si formando misturas complexas que se distribuem nos corpos hídricos. Esta interação entre diferentes genotoxinas pode levar a efeitos aditivos, sinérgicos e até mesmo antagonistas (Chen *et al.*, 1983; Houk, 1992; Müller *et al.*, 2002). Com o objetivo de estimar o risco genético imposto aos ecossistemas pelas misturas heterogêneas diversas metodologias de detecção de genotoxicidade estão sendo empregadas para a análise dos efeitos tóxico genéticos de amostras totais de origem urbana, industrial e/ou rural.

## 1.2. Bioensaios Utilizados

---

Dentre os ensaios mais empregados para a avaliação da toxicidade genética associada a misturas complexas destaca-se o Teste de Ames que, através do uso de linhagens específicas de *Salmonella typhimurium*, fornece informações sobre alterações genéticas do tipo mutação gênica

(McGeorge *et al.*, 1985; Houk, 1992; Vargas *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2001). A utilização deste bioensaio, em diferentes abordagens experimentais, evidenciou que despejos oriundos de diferentes tipos de indústrias apresentam um espectro de resposta mutagênica variável, dependente do tipo de produto processado. Quando se consideram todos os tipos de efluentes industriais avaliados, as potências mutagênicas distribuem-se dentro do intervalo compreendido entre  $10^2$  a  $10^{12}$  revertentes por litro de amostra. De fato, dejetos que induzem valores iguais ou superiores a  $10^{12}$  revertentes por litro impõem um grave risco aos ecossistemas. Entretanto, os incluídos no extremo inferior do espectro ( $10^2$  revertentes/l), são considerados como tendo um baixo risco como indutores de mutações gênicas. Ao mesmo tempo, a associação entre potência mutagênica e composição dos efluentes originados por cada indústria revela que as empresas responsáveis pela produção de furazolidona e nitrofurfural são as que contribuem com os maiores índices de potência mutagênica, seguidas das refinarias de petróleo, indústrias de forja, de produção de compostos orgânicos e de resíduos gerados por fornalhas de coque (Figura 2).

Outro ponto relevante a ser considerado relaciona-se com a avaliação da toxicidade genética associada a diferentes categorias de efluentes industriais – onde são incluídas indústrias de corantes, resinas, compostos orgânicos e petróleo. De fato, observou-se que as empresas produtoras de corantes e de compostos orgânicos – a despeito de estarem incluídas na categoria moderadamente mutagênica – são as principais responsáveis pela emissão de efluentes genotóxicos, contribuindo com, respectivamente, 84% e 72% das respostas positivas obtidas através do Teste de Ames (McGeorge *et al.*, 1985; Claxton *et al.*, 1998).

Este bioensaio foi utilizado para investigar o potencial genotóxico do



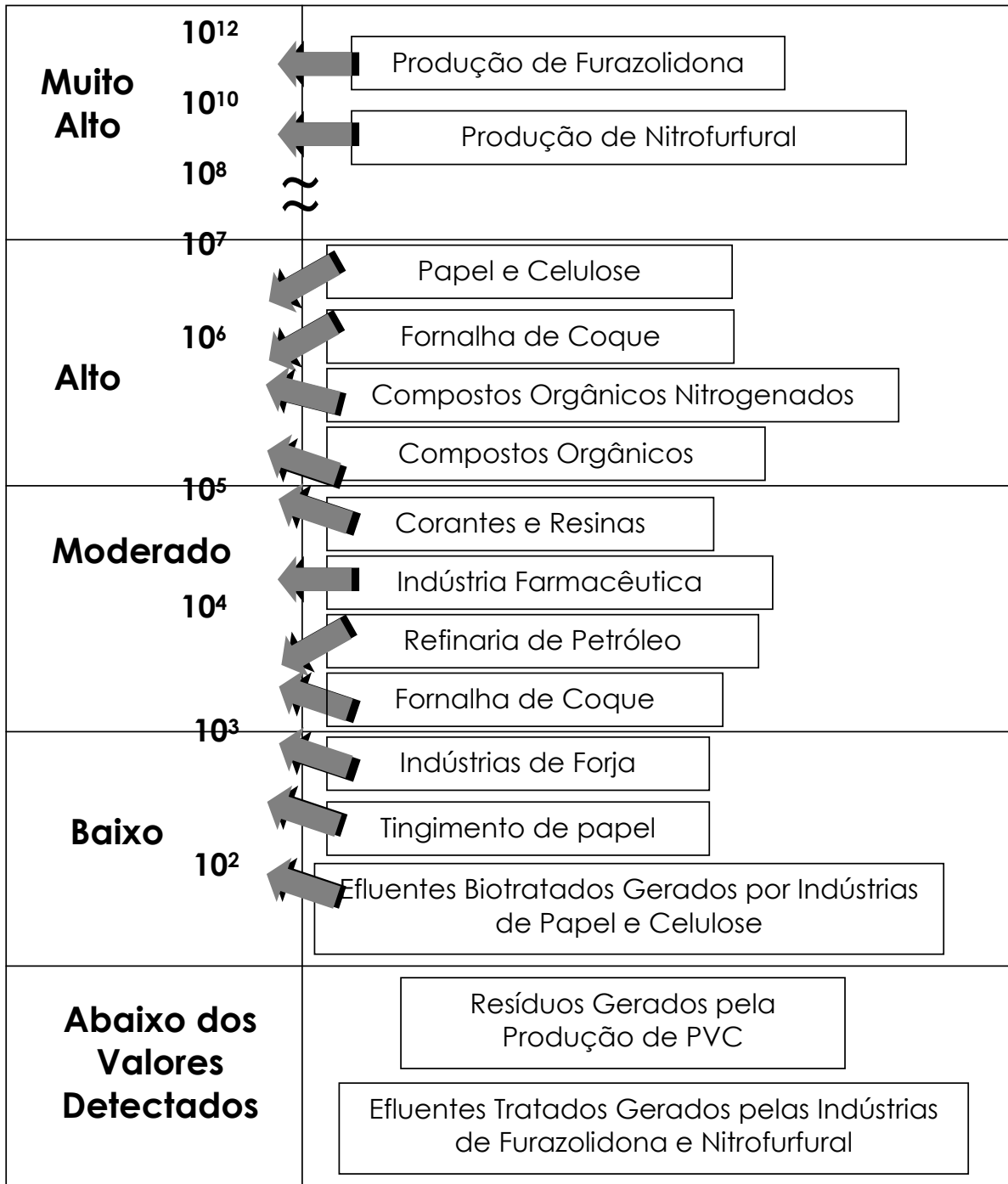


Fig. 2: Potências mutagênicas obtidas pelo Teste de Ames (revertentes por litro de efluente), de acordo com Claxton *et al.*, 1998, baseado em Houk, 1992.

lago Taihu (China), que recebe constantes descargas de dejetos industriais. Dos quatro pontos analisados, três apresentaram resposta positiva na cepa TA98, em presença ou ausência da fração S9. Uma vez que a análise dos dados obtidos com a cepa TA100 não foi estatisticamente significativa, os autores concluíram que a genotoxicidade observada está predominantemente associada a mutações pontuais por deslocamento no módulo de leitura. Embasamento para esta premissa foi fornecido pelos dados obtidos no Teste Ara (Arabinose Resistance Test), utilizando estas mesmas amostras (Shen *et al.*, 2001). Ainda utilizando esta abordagem experimental, Siddiqui e Ahmad (2003) avaliaram amostras de três corpos d'água na região de Aligarh, Índia, que estão sob intenso impacto de atividades industriais – mostrando a sua ação como indutoras de mutações pontuais.

A atividade mutagênica dos três principais rios que fluem através da área central de Fukui, Japão, foi testada em duas linhagens de *Salmonella typhimurium* - YG1024 e YG1029 derivadas, respectivamente, das cepas TA98 e TA100 - que apresentam altos níveis constitutivos de O-acetiltransferase e, como consequência, detectam a mutagenicidade dos compostos nitro aromáticos, aminas e hidroxí-aminas. Para a realização desta análise foram escolhidos seis pontos em cada rio, que foram coletados sazonalmente, de julho de 1998 a agosto de 2000. Os dados obtidos apontaram para a mutagenicidade de cerca de 87% das amostras de água, ainda que os maiores valores de potência mutagênica tenham sido observados na linhagem YG1024 com adição de S9. O fracionamento destas amostras permitiu identificar como principal contaminante os compostos do tipo 2-fenilbenzotriazol (PBTA), provenientes de indústrias têxteis – que de forma contínua e severa contaminam estes rios (Watanabe *et al.*, 2002). É também importante enfatizar que, a despeito da ampla distribuição do espectro mutagênico de diferentes indústrias, efluentes de empresas que produzem produtos

afins induzem valores de potência mutagênica que diferem em apenas uma ordem de magnitude o que, na maioria das vezes, pode ser atribuído a uma classe específica de composto químico (Houk, 1992; Claxton *et al.*, 1998).

Na avaliação de amostras ambientais sujeitas a impacto de origem rural, Rehana *et al.* (1996) utilizaram o Teste de Ames para analisar diferentes extratos de amostras do rio Ganges, na Índia. Resultados significativos de indução de revertentes foram obtidos nas cepas TA102, TA98, TA100 e TA97, tendo sido observado um expressivo aumento na resposta mutagênica, quando a fração S9 foi adicionada ao sistema. A análise química mostrou que os níveis de quase todos os pesticidas organoclorados e organofosforados estavam acima dos limites permitidos para corpos d'água, sugerindo que estes compostos tenham sido os principais responsáveis pelos resultados de toxicidade genética observados.

Adicionalmente, testes delineados para a detecção de eventos associados com perda de cromossomos inteiros ou deleções de fragmentos cromossômicos, foram aplicados para a avaliação da ação genotóxica de amostras de corpos d'água sob a influência de despejos industriais, urbanos e agrícolas. Um exemplo do uso destes bioensaios pode ser observado nas amostras coletadas no lago Taihu (China) - submetido a constantes lançamentos de dejetos de indústrias locais. O Teste de Micronúcleos em *Vicia faba* foi utilizado para a triagem de mutágenos em 39 sítios de coleta, possibilitando *(i)* observar diferentes graus de mutagenicidade entre os pontos do Taihu e *(ii)* mapear a distribuição dos poluentes ao longo do lago. Ainda na tentativa de detectar a provável contribuição das águas dos mananciais, que formam o Taihu, na genotoxicidade observada, foi empregado o Teste de Micronúcleos em linfócitos humanos - em 5 dos principais rios que deságuam no lago. Diagnósticos positivos foram detectados em 4 das 5

amostras analisadas, demonstrando que tais corpos d'água estão contribuindo significativamente para a toxicidade genética observada no lago Taihu (Kong *et al.*, 1998). Ensaio de genotoxicidade em *Allium cepa*, tanto para detecção de Mutações Cromossômicas em Anáfase, como de Micronúcleos, foram também utilizados por Grover e Kaur (1999) para a avaliação do potencial genotóxico de amostras cruas e de extratos - não só de esgotos urbanos, como também de lodo de efluentes de duas indústrias, uma de papel e outra de tintura de tecidos - na região de Amritsar, Índia. Ainda que os resultados do Teste de Micronúcleos tenham sido negativos para todas as amostras derivadas do esgoto urbano, o Teste de Mutação Cromossômica em Anáfase demonstrou um aumento significativo na ocorrência de mutações, em um nível bem superior ao de extratos de lodo industrial. Comparando os dois tipos de dejetos, assim como os dados observados em ambos os ensaios genéticos, foi possível concluir que os municipais induzem um efeito genotóxico superior aos dos produzidos pelas indústrias.

O Ensaio de Micronúcleos em *Tradescantia paludosa* também tem sido empregado para análise de amostras ambientais, tendo como principal vantagem - em comparação com os testes citogenéticos em culturas de células de mamíferos e os ensaios de mutagenicidade em bactérias - o fato de que este organismo experimental pode ser exposto *in situ*, sem envolver qualquer processo de filtração ou de concentração (Steinkellner *et al.*, 1999). Quando foi empregado como ferramenta para determinar a genotoxicidade de amostras de água coletadas nos rios Kui e Xiaoqing (China), os resultados revelaram a genotoxicidade inerente a todos os pontos de coleta. O grau de poluição encontrado, nos diferentes pontos ao longo do rio Kui, está associado com os dejetos de diferentes tipos de indústrias. Entretanto, a amostra que induziu um maior aumento na frequência de micronúcleos está localizada próxima à descarga de uma indústria de plásticos (Ji *et al.*, 1999). Em relação ao rio Xiaoqing, as

amostras induziram fortes respostas positivas – inclusive na concentração mais baixa (25%) - o que aponta para altos índices de poluição ambiental. As principais fontes de contaminação associadas a este rio são provenientes das indústrias de compostos químicos, couro, papel e corantes (Miao *et al.*, 1999). Esta mesma metodologia evidenciou a toxicidade genética de 12 pontos costeiros, distribuídos ao longo do lago Dianchi (China), que recebe lançamento de efluentes industriais. Ainda que tenha sido demonstrado que estes efluentes induzem eventos genotóxicos, as amostras coletadas na estação de seca mostraram uma maior potência do que as coletadas durante a estação chuvosa, em função da maior concentração de toxinas presentes no período de escassez de chuvas (Duan *et al.*, 1999).

Através do Bioensaio de Micronúcleos em *Tradescantia*, foi possível determinar os níveis de poluição de três rios que passam pela cidade de Fuzhou na China. Todas as amostras de água analisadas induziram níveis significativos de micronúcleos, quando testadas na sua forma não diluída. Entretanto, os rios apresentaram graus de contaminação diferentes. A origem da poluição é atribuída, principalmente, a presença de indústrias que lançam seus rejeitos diretamente nos rios (Zeng *et al.*, 1999). Este mesmo ensaio foi utilizado para avaliar amostras provenientes dos dois principais rios da Áustria – Danúbio e Salzach - demonstrando a ausência de substâncias com potencial clastogênico nestas amostras, que estão sob influência de despejos industriais (Steinkellner *et al.*, 1999).

Utilizando três bioensaios – delineados para a Detecção de Mutações Cromossômicas em *Allium cepa*, Micronúcleos e Mutação Pontual em *Tradescantia* – Kong e Ma (1999) compararam a genotoxicidade de amostras de água e de solo provenientes de diferentes fazendas no estado de Illinois, EUA. Observaram que os extratos de solo, assim como os corpos d'água adjacentes às regiões agrícolas, induziram

aumentos significativos na freqüência dos diferentes eventos genotóxicos avaliados, em ambos os organismos experimentais utilizados.

Outro bioensaio utilizado na análise de amostras ambientais é o Teste Cometa, que foi capaz de detectar a presença de substâncias indutoras de lesões no DNA - em amostras de água do rio Tirupur na Índia, que está sobre forte influência de dejetos de indústrias têxteis e de alvejantes. A caracterização química das frações revelou a existência de aminas aromáticas que são as responsáveis pelas respostas positivas observadas nas culturas de linfócitos humanos, configurando que esta contaminação está relacionada às indústrias acima mencionadas (Rajaguru *et al.*, 2002).

Na busca da identificação dos riscos impostos ao ambiente por contaminantes ambientais, um número razoável de bioensaios de curta duração tem servido como excelente ferramenta para o monitoramento do risco imposto por efluentes industriais, urbanos e/ou rurais, assim como da qualidade dos corpos hídricos recipientes – reforçando a importância e a adequação do emprego de diferentes bioensaios de genotoxicidade para a avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos.

### **1.3. Caracterização do Local de Estudo – Região Hidrográfica do Guaíba**

---

A Região Hidrográfica do Guaíba abrange o eixo que vai da região metropolitana de Porto Alegre (começando na Ponta do Gasômetro e percorrendo 50 km até a Laguna dos Patos), a Caxias do Sul, chegando a Passo Fundo e São Gabriel. Tem uma área de 84.763 km<sup>2</sup>, o equivalente a 30% do território gaúcho. Nela, estão situados os núcleos industriais mais importantes do estado, concentrando 2/3 da produção industrial do Rio Grande do Sul, e os centros urbanos mais populosos, onde vivem 70% da

população. Nesta área situam-se siderúrgicas, refinarias de petróleo, indústrias de celulose e papel, de cimento, termoelétricas a carvão e pólo petroquímico, dentre outras plantas industriais. Somam-se a isto as atividades agrícolas, como as lavouras de arroz e fumo, que consomem 20% de agrotóxicos vendidos no país, os loteamentos nas margens dos rios ou em áreas de nascentes, as atividades decorrentes da vida urbana, assim como o despejo de águas de lavagem, óleo e lixo resultantes das atividades portuárias. O Guaíba, é formado pelos rios Jacuí (84,6%), dos Sinos (7,5%), Caí (5,2%) e Gravataí (2,7%), recebendo também as águas dos arroios situados em suas margens.

Na Região Hidrográfica do Guaíba localizam-se 251 municípios, distribuídos em oito sub-bacias, definidas pelo Sistema Estadual de Recursos Hídricos, em função do maior rio que drena a sua área física e que passam a constituir as unidades regionais de planejamento: Guaíba, Gravataí, Sinos, Caí, Taquari-Antas, Alto Jacuí, Vacacaí – Vacacaí Mirim e Pardo/Baixo Jacuí (Figura 3).

### **1.3.1. Bacia do Guaíba**

Os rios Gravataí, Sinos, Caí e Jacuí contribuem para a formação do Guaíba, que, por sua vez, margeia os municípios de Porto Alegre, Eldorado do Sul, Guaíba, Barra do Ribeiro e Viamão, desembocando na Laguna dos Patos, limite sul da Região Metropolitana de Porto Alegre. Os principais afluentes do Guaíba, na margem direita, originam-se em regiões dentro do contexto da unidade geomorfológica do Escudo Sul-Riograndense e são os arroios Petim, Ribeiro, do Conde e Araçá. Na margem esquerda, os arroios Dilúvio, Salso, Taquara e Itapuã deságuam diretamente no Lago

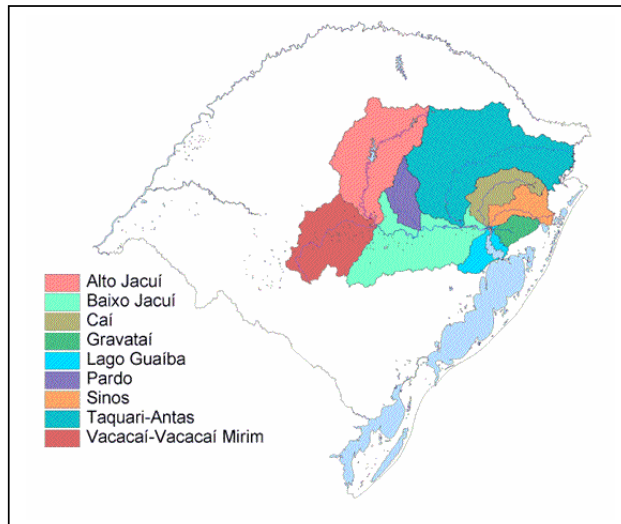


Figura 3: Região Hidrográfica do Guaíba e suas Sub-Bacias (Pró- Guaíba, 2004)

Guaíba. O lago Guaíba é o receptor dos efluentes das cidades de Porto Alegre, Guaíba, Eldorado do Sul, Barra do Ribeiro e Viamão além de receber as contribuições de seus formadores, os rios Caí, Jacuí, Sinos e Gravataí.

### 1.3.2. Bacia do Gravataí

A sub-bacia Gravataí é uma bacia de pequena dimensão, não existindo afluentes de porte em termos de vazão. O rio Gravataí recebe a contribuição de alguns arroios drenantes das águas de vertentes, tais como o Demétrio e o Barnabé, alimentados pelas chuvas, e dos banhados a montante, nas imediações de Santo Antônio da Patrulha. Este curso d'água desemboca no Delta do Jacuí - suas nascentes localizam-se no divisor de águas com o rio dos Sinos a 400 m de altitude. A região do Banhado Grande, originalmente de maior extensão, funciona, sob o ponto



de vista hidrológico, como um regulador de vazões a montante do rio Gravataí.

Nesta sub-bacia predominam atividades tipicamente rurais, na área de várzeas, e o uso urbano-industrial a jusante da cidade de Gravataí.

### **1.3.3. Bacia do Sinos**

O rio dos Sinos tem suas nascentes junto ao município de Riozinho, na zona leste do Estado, correndo no sentido leste-oeste até a região de Campo Bom, quando inflecte para a esquerda assumindo a direção norte-sul até desembocar no Delta do Jacuí. Os seus principais afluentes são os rios Paranhana, Padilha, Rolante e o arroio da Areia.

Esta sub-bacia sofre forte ação antrópica, nos cursos médio e baixo e na bacia do Paranhana, ocasionada por uma intensa concentração urbano-industrial.

### **1.3.4. Bacia do Caí**

O rio Caí possui suas cabeceiras no município de São Francisco de Paula na unidade geomorfológica do Planalto, desenvolvendo-se na direção leste-oeste até as proximidades de Nova Petrópolis, a partir de onde passa a fluir no sentido norte/sul, nos arredores de São Sebastião do Caí, até sua desembocadura no Delta do Jacuí. Os principais tributários deste rio, em sua margem esquerda, são o rio Santa Cruz e arroio da Cadeia, e, em sua margem direita, os arroios Piaí e Forrameco.

Esta região caracteriza-se por atividade agrícola em pequenas propriedades e uso urbano-industrial acentuado, principalmente na região de Caxias do Sul, Bento Gonçalves e Nova Petrópolis.

### **1.3.5. Bacia do Taquari-Antas**

O rio das Antas e o rio Taquari são os principais cursos de água formadores desta sub-bacia, também de grande importância territorial e sócio-econômica.

O rio das Antas possui suas nascentes nos municípios de Cambará do Sul e Bom Jesus, dentro da unidade geomorfológica do Planalto, correndo no sentido leste-oeste, onde predomina a atividade pecuária. Este perfil começa a se modificar na altura de Antônio Prado, onde predomina a atividade agrícola intensiva em pequenas propriedades e onde ocorrem densidades populacionais mais altas. O rio possui como principais tributários em sua margem esquerda, os rios Santana, Tainhas, Lajeado Grande e em, sua margem direita, o rio Turvo e o arroio da Esteira.

A partir da sua confluência com o rio Turvo, este rio passa a se denominar Taquari, inclusive adquirindo maior expressão em termos de volume. O rio Taquari, em seu percurso norte-sul sobre a unidade geomorfológica da Borda Erodida do Planalto, desemboca no rio Jacuí, na região de Triunfo. Os principais afluentes deste rio, na sua margem esquerda, são os arroios Potreiro e Catupi e, na sua margem direita, os rios Carreiro, Guaporé, Forqueta, Taquari-Mirim e o arroio Sampaio.

Os cursos de água da margem esquerda são muito influenciados por atividades como a mineração e a agricultura. Já os cursos da margem direita sofrem grandes intervenções causadas por aglomerados urbanos industriais.

### **1.3.6. Bacia do Alto Jacuí**

O rio Jacuí possui suas nascentes próximas a cidade de Passo Fundo, sobre a unidade geomorfológica do Planalto Meridional, numa altitude aproximada de 730 m. O rio desce o Planalto no sentido norte-sul, até sua

confluência com o rio Vacacaí, na região correspondente ao município de Cachoeira do Sul. Os principais cursos d'água contribuintes do rio Jacuí são, em sua margem direita, os rios Jacuí-Mirim, Ivaí, Saturno, Vacacaí-Mirim e Vacacaí e, em sua margem esquerda, o rio Jacuizinho, e os arroios Curupá, São Bento e Porongos.

Durante seu percurso, este rio passa por regiões em que prevalecem características geográficas e sócio-econômicas distintas, havendo forte interferência de atividades agrícola, mineração de pedras preciosas (Salto do Jacuí) e industrial (região de Passo Fundo). Além disto, o rio sofre represamento pelas barragens de Passo Real, Ernestina e Itaúba, na região a montante de Salto Jacuí.

### **1.3.7. Bacia do Vacacaí – Vacacaí Mirim**

O rio Vacacaí possui suas nascentes na região do município de São Gabriel, correndo no sentido sudoeste – nordeste até as proximidades da cidade de Santa Maria, onde sofre uma inflexão para a direita, passando a correr no sentido oeste-leste até desembocar no rio Jacuí. Os principais tributários deste rio são, na sua margem esquerda, o arroio Arenal e na margem direita o rio São Sepé e o arroio Igá. Outro rio importante nesta sub-bacia é o rio Vacacaí-Mirim, que desagua na margem direita do rio Jacuí e drena, principalmente, o município de Santa Maria.

O solo é ocupado preponderantemente por latifúndios, onde é desenvolvida extensiva atividade agro-pecuária.

### **1.3.8. Bacia do Pardo/Baixo Jacuí**

Após a confluência com o rio Vacacaí, o rio Jacuí sofre uma inflexão para a esquerda passando a correr sobre a unidade geomorfológica da Depressão Central, no sentido oeste-leste por cerca de 300 km, até sua foz

no Delta do Jacuí junto à cidade de Triunfo. Na sua margem esquerda, os principais tributários do rio Jacuí, em seu curso médio a inferior, são os rios Pardo, rio Taquari e arroio Gil; na sua margem direita, são os arroios Itapoã, Pequeri, Capivari, dos Ratos e Ibacuru.

A região ao longo do curso médio do rio Jacuí sofre muitas interferências causadas pela atividade antrópica, sendo característica a atividade minerária de carvão mineral na região de Charqueadas e São Jerônimo. No seu curso inferior é característica a atividade urbana e industrial, destacando-se o Pólo Petroquímico de Triunfo (Pró-Guaíba, 2001).

### **1.3.9. Avaliação da Genotoxicidade**

---

A estimativa da toxicidade genética associada à Região Hidrográfica do Guaíba, iniciou-se em 1983, centrada no curso final do rio Caí - uma vez que esta região sofre influência direta do Pólo Petroquímico do Sul. Foram avaliados vários pontos localizados no interior do complexo industrial - bacias de acumulação e segurança, efluentes industriais, áreas de extravasamento de águas do parque industrial, bem como os arroios Canal Sul, Norte e Bom Jardim – que mostraram, na sua maioria, respostas positivas no Teste *Salmonella*/Microsoma (Vargas *et al.*, 1988). O espectro de respostas mutagênicas positivas incluiu: Km 24,1 (6%), Km 18,6 (25%), Km 13,6 (42%), Km 13,3 (15%) e Km 10,6 (12%). Os pontos com os três maiores valores de potência mutagênica estão localizados próximo às áreas de disposição do efluente líquido, bacias de acumulação e segurança da drenagem pluvial, assim como no Canal Sul. O Ensaio de Microtriagem por Indução Lisogênica foi a segunda metodologia de avaliação genotóxica empregada mostrando resposta fraca positiva no Km 10,6 ou positiva nos demais locais de amostragem, à exceção do Km 18,6 – quando em ausência de metabolização. Já em presença de S9 não foram

evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes pontos de coleta e os respectivos controles negativos - sugerindo que as genotoxinas presentes nestas amostras são de ação direta e que em presença de enzimas de metabolização são encaminhadas para detoxificação. Também foi estimada a atividade mutagênica e recombinogênica destas amostras, na fase estacionária e exponencial de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Na fase estacionária, observou-se acréscimo nas freqüências de eventos relacionados com permuta (Km 24,1) e conversão gênica (Km 18,6 e 13,6). Entretanto, na fase exponencial, os resultados estatisticamente significantes restringiram-se apenas à indução de permuta mitótica no Km 18,6. Segundo os autores, a variabilidade da resposta observada deve-se a variações fisiológicas e metabólicas, assim como à ação de mecanismos de reparação, que estariam ativos somente na fase exponencial de crescimento (Vargas, 1992; Vargas *et al.*, 1993).

Associadas a estas análises foram empregadas técnicas citogenéticas *in vitro* para a avaliação da indução de aberrações cromossômicas, utilizando o Método de Bloqueio da Citocinese (CBMN), em cultura de linfócitos humanos - nos mesmos locais avaliados por Vargas *et al.* (1988), com inclusão do ponto Km 14,1. Os resultados obtidos revelaram a presença de substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico em todos os sítios de amostragem. A indução de micronúcleos foi mais freqüente no Km 18,6 - localizado próximo à área de disposição do efluente industrial final líquido e da drenagem da área de disposição dos resíduos sólidos - com 44% do total de resultados positivos. Os demais sítios de coleta também apresentaram respostas positivas, embora com incrementos menos marcantes. Cerca de 28% do total de respostas está associado ao ponto Km 24,1, seguido do Km 13,6 (17%) e do Km 14,1 (11%) (Lemos e Erdtmann, 2000).

Na tentativa de avaliar e comparar os riscos impostos pelos efluentes industriais e urbanos - lançados no curso final do rio Caí - foi empregado o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART), em *Drosophila melanogaster*. Através desta metodologia dejetos urbanos foram diagnosticados como indutores de recombinação somática, embora os pontos sob influência de descargas industriais tenham sido caracterizados como destituídos de ação genotóxica (Amaral *et al.*, no prelo).

Da mesma forma que o Caí, o rio dos Sinos também vem sendo alvo de estudos, já que está sob a influência direta de descargas de indústrias metalúrgicas, químicas, têxteis, de alimentos, couro e calçados - ainda que o diagnóstico de substâncias genotóxicas neste manancial seja muito recente. O trabalho delineado por Vargas *et al.* (2001) visou avaliar a genotoxicidade de amostras de água, superficial e intersticial, e de sedimentos do rio dos Sinos, através dos testes de *Salmonella*/Microsoma e de Microtriagem por Indução Lisogênica, utilizando o método direto e o de fracionamento. Em relação ao primeiro ensaio, foi observada a presença de compostos mutagênicos, restrita aos sedimentos, frente à linhagem TA97, na ausência de ativação metabólica. Entretanto, respostas positivas foram detectadas, tanto nas amostras de água quanto nas de sedimento, quando o teste empregado foi o de Indução Lisogênica. A toxicidade genética dessas amostras foi atribuída a metais pesados e a compostos orgânicos, presentes nas frações polares e não-polares.

Quando amostras de água e de sedimento do Lago Guaíba - que estão sob influência direta de dejetos de origem urbana provenientes da cidade de Porto Alegre - foram avaliadas através do Teste de Ames e do de Aberrações Cromossômicas em medula óssea de camundongos foram encontrados dados positivos somente nas amostras de sedimento avaliadas na linhagem TA98, sem adição da fração S9 (Guimmler-Luz *et*

*al.*, 1992; Rolla, 1995; Rolla e Henriques, 1996; 1997). Recentemente, foi desenvolvido um estudo que procurou avaliar a mutagenicidade das águas superficiais dos rios que compõem a Região Hidrográfica do Guaíba, através do Teste de Ames – sendo observada apenas uma resposta positiva na linhagem TA98, em presença de ativação metabólica, restrita a amostra coletada no lago Guaíba. Foram também evidenciados indícios de mutagenicidade nos rios dos Sinos, Caí e Jacuí, - relacionados basicamente a presença de mutágenos de ação indireta cuja ação está restrita a indução de mutações por substituição em pares de base. Na tentativa de estabelecer uma correlação entre estas respostas e a presença de genotoxinas específicas, as amostras foram analisadas para a identificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (criseno e benzo[a]pireno), de pesticidas (pentaclorofenol, organofosforados e carbamatos) e de elementos inorgânicos. Estas análises sugerem que os indícios de mutagenicidade observados estão relacionados exclusivamente à presença de compostos inorgânicos (Villela, 2001).

## 1.4. O Teste SMART

---

Dentre os bioensaios ainda pouco utilizados para avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais, encontra-se o teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática - SMART - em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. O SMART, além de utilizar um organismo experimental eucarioto, com estreita similaridade genética e bioquímica quando comparado aos mamíferos (St. John e Xu, 1997), possibilita a detecção simultânea de mutação gênica, aberrações cromossômicas – representadas por eventos aneugênicos e clastogênicos – e/ou recombinação somática (Graf *et al.*, 1984; Würigler e Vogel, 1986; Vogel e Zijlstra, 1987). Permite, também, a detecção de genotoxinas de

ação direta, assim como daquelas que, somente quando metabolizadas exercem sua atividade genotóxica (Graf e Singer, 1989; Frölich e Würgler, 1990; Graf e van Schaik, 1992; Delgado-Rodriguez *et al.*, 1995).

Neste ensaio genético, a amostra a ser analisada entra em contato com as células dos discos imaginais presentes na larva, que proliferam até se diferenciarem, durante a metamorfose, em estruturas das asas da mosca adulta. A análise dos possíveis danos causados é feita pela observação de grupos celulares (manchas) com fenótipo marcador específico (*flr<sup>3</sup>* ou *mwh*), que se manifesta visualmente na forma de tricomas mutantes. Estes fenótipos expressam-se devido à perda da heterozigose, induzida pelos diferentes tipos de eventos genotóxicos acima referidos. Enquanto o número de manchas fornece resultados quantitativos sobre os danos induzidos, os tipos de manchas dão informações sobre a natureza da lesão que os originou. Manchas simples – que expressam apenas um dos fenótipos mutantes, *flr<sup>3</sup>* ou *mwh* – indicam a ocorrência de mutação gênica e/ou cromossômica, assim como de eventos recombinogênicos. Por outro lado, manchas gêmeas – formadas por clones *flr<sup>3</sup>* e *mwh* adjacentes – são originadas exclusivamente por recombinação somática (Graf *et al.*, 1984). Também o tamanho das manchas pode nos fornecer informações valiosas, já que está correlacionado com o tempo de atuação da genotoxina ao longo da embriogênese e, desta forma, com o momento da indução do dano genético (Graf, 1995).

Aproximadamente 400 compostos – documentados em aproximadamente 100 publicações - já foram analisados através do teste SMART de asa, sendo, na sua maioria, produtos puros. Da mesma forma, misturas complexas também já foram testadas, dentre elas algumas bebidas – alcoólicas ou não – extratos de chás, diferentes tipos de cafés, vinhos e conhaque (van Schaik *et al.*, 1984; Graf e Würgler, 1986; Graf *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 2004). Este bioensaio foi ainda aplicado para



investigar o potencial genotóxico de partículas aéreas (Graf e Singer, 1989; Delgado-Rodriguez *et al.*, 1995; 1999). Os resultados destes estudos – que apresentaram uma boa correlação com aqueles obtidos através do Teste de Ames - demonstraram a sensibilidade do teste SMART em relação à fração orgânica de amostras ambientais (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1995).

Entretanto, pode-se dizer que o Teste SMART de asa tem sido ainda muito pouco utilizado para avaliação da genotoxicidade de amostras ambientais e, desta forma, pouco explorado como uma ferramenta para o diagnóstico da toxicidade genética associada ao meio ambiente. Portanto, tanto sua adequação como sua sensibilidade para este fim são ainda pouco conhecidas.

## 1.5. Teste CBMN

---

O teste de micronúcleo *in vitro* é uma importante ferramenta para a Genética Toxicológica, sendo amplamente empregado nas áreas de ecotoxicologia (Gauthier *et al.*, 1999), nutrição (Fenech e Rinaldi, 1995; Fenech e Ferguson, 2001), biomonitoramento de populações humanas (Fenech *et al.*, 1999), epidemiologia molecular (Norppa, 1997, Falck *et al.*, 1999) e principalmente na identificação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (Kirsch-Volders, 1997), assim como, de amostras de origem ambiental (Lemos e Erdtmann, 2000).

O Teste de Micronúcleo baseia-se na identificação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não estão integrados ao conjunto de cromossomos de uma célula - formando, assim, um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (MN). A análise de MN é usada como padrão de aberrações cromossômicas em organismos eucarióticos, sendo, portanto, utilizada na detecção de agentes que interferem no

processo de ligação do cromossomo às microfibras do fuso ou aqueles capazes de induzir quebras cromossômicas (Fenech, 2000).

Em função da dificuldade de obtenção de células eritropoéticas da medula óssea humana, foram desenvolvidas técnicas de análise de MN em células cultivadas, a partir de linfócitos humanos provenientes de sangue periférico. Estas células são de fácil obtenção e estão, na sua maioria, na fase  $G_0$  do ciclo celular. Os linfócitos transitam no sangue, passam através do baço, dos nódulos linfáticos e outros tecidos, e voltam à circulação sanguínea através dos ductos linfáticos. O tempo total de recirculação é de aproximadamente 12 horas. Este sistema permite, portanto, a detecção de mutações tanto em linfócitos do sangue periférico como naqueles distribuídos em diferentes órgãos – este parâmetro é de fundamental importância na investigação de populações humanas expostas a contaminantes químicos e físicos (Ferrari, 1991).

O Teste de MN em cultura de linfócitos humanos – Ensaio CBMN (Cytokinesis-Block Micronucleous Assay), baseia-se no uso da citocalasina B (CIT-B), conforme proposto por Fenech e Morley (1985), que é um agente inibidor da polimerização da proteína actina necessária para a formação do anel de microfilamentos que induz a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células-filhas - citocinese. O emprego da citocalasina B resulta em um acúmulo de linfócitos binucleados a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão. Havendo a formação de micronúcleos, eles também ficarão contidos no citoplasma. Desta forma, a análise em células binucleadas, permite uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas, já que seria necessário analisar o dobro de linfócitos mononucleados para observar o mesmo nível de lesões observados em binucleados (Fenech, 1997).

Este teste tem sido amplamente empregado, uma vez que apresenta algumas vantagens: *(i)* facilidade na identificação das células binucleadas portadoras de micronúcleo, o que torna o teste mais sensível

e acurado; *(ii)* detecção da citotoxicidade associada à extensão e progressão da divisão celular *(iii)* instabilidade genômica e amplificação gênica relacionadas, respectivamente, a pontes nucleoplasmáticas e broto nuclear (Fenech, 2000). Além disso, as contínuas inovações introduzidas no protocolo sinalizam para a ampliação da aplicabilidade do teste na solução de novos problemas, assim como para a definição de seu uso como parte da bateria de testes recomendados pelas agências governamentais para o registro de novos produtos que entram anualmente no mercado mundial.

## 1.6. Objetivos

---

São notórias a necessidade e a urgência de se avaliar os riscos genéticos impostos pelos resíduos decorrentes da ação antrópica sobre os ecossistemas. A alta concentração dos dejetos de origem urbana e industrial lançados na área da Região Hidrográfica do Guaíba é um dos principais problemas ambientais da região – esgotos domésticos, resíduos industriais, lixo domiciliar e poluição do ar por fontes industriais e veiculares. Nas áreas rurais, os problemas mais críticos são a erosão do solo, o assoreamento dos cursos d'água, a contaminação por agrotóxicos, assim como de resíduos orgânicos (FEPAM, 2003). Adicionalmente, a utilização de bioensaios mais informativos como hábeis ferramentas para avaliar a genotoxicidade neste tipo de área de risco é outro aspecto de fundamental importância.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar através do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Mitótica (SMART) em *Drosophila melanogaster* amostras de água superficial de diferentes pontos da Região Hidrográfica do Guaíba que sofrem influência direta de dejetos líquidos não tratados, que estão sob influência de atividade agrícola, urbana e/ou industrial.
  
- Dentro desta mesma perspectiva, foi empregado o Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (CBMN) em cultura de linfócitos humanos, visando correlacionar os dados obtidos neste ensaio com os observados no SMART, na busca de delinear o provável mecanismo de ação das genotoxinas que estão presentes nos diferentes rios que formam a Região Hidrográfica do Guaíba.

---

## Capítulo II

---

**Genetic Toxicity In Surface Water From Guaíba  
Hydrographic Region Under The Influence Of  
Industrial, Urban And Agricultural Sewage In The  
Drosophila Wing-Spot Test**

---

*Environmental Pollution*, enviado para publicação

Manuscript for Environmental Pollution

**GENETIC TOXICITY IN SURFACE WATER FROM GUAÍBA HYDROGRAPHIC REGION UNDER THE INFLUENCE OF INDUSTRIAL, URBAN AND AGRICULTURAL SEWAGE IN THE DROSOPHILA WING-SPOT TEST.**

**Viviane Souza do Amaral<sup>1</sup>, Marialva Sinigaglia<sup>1</sup>, Maria Luiza Reguly<sup>1</sup> and Heloisa Helena Rodrigues de Andrade <sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Mutagênese, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

“Capsule”: Drosophila Wing-Spot Test can be used for detection of environmental mutagenesis.

\*Correspondence: Heloísa H. R. de Andrade, Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – ULBRA, Prédio 22, 4º andar, Av. Farroupilha, 8001, 92420-280, Canoas, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 4779214.

E-mail:heloisa@ulbra.br

**Abstract**

Mutagenic and recombinagenic activity of surface waters in the Guaíba Hydrographic Region (RS, Brazil) was investigated using the SMART in *Drosophila melanogaster*. Two positive results in Caí River (September 2000 and August 2001) and in Taquari River (August 2001 and February 2002) - linked to direct recombinagenic toxicants were observed. In Jacuí samples, an indirect mutagenic and recombinagenic action was detected in September 2000 collection and a direct recombinational activity was observed in February 2002. Also in February 2002 - samples from Dilúvio Brook and Guaíba Lake (GPC) were able to induce wing spots by mitotic recombinagenesis. The former sampling site showed toxicants to have a direct action, and the latter an increment in mitotic recombination that depended on metabolic action. The SMART wing test shows that all positive responses were mainly related to homologous mitotic recombination.

**Keywords:** SMART, Genotoxicity, Guaíba Hydrographic Region, *Drosophila melanogaster*, Mitotic Recombination.

## 1. INTRODUCTION

In the current study, the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* was used to assess the genotoxicity of river water samples from Guaíba Hydrographic Region (Rio Grande do Sul, Brazil), which covers 84 763 km<sup>2</sup> and spreads onto 251 counties. About 6.5 million people inhabit 30% of the state territory, the majority in urban (83.5%) and only 16.5% in rural areas. Nine hydrographic basins are responsible for more than 70% of the state's gross domestic product (Figure 1). The intense economic activity, mainly industrial and agricultural, has created a severe pressure upon the state's natural resources. The major environmental problems within the urban areas are the industrial contamination, the irregular waste disposal and the untreated sewage runoff into water streams. In the rural areas, the environmental damage is caused by the pollution of agricultural chemical products, deforestation, lack of basic sewage treatment system, erosion and salutation of rivers and streams (Pró-Guaíba, 2004).

The *Drosophila* wing SMART provides a rapid means to assess the potential of chemicals and/or complex mixtures to induce loss of heterozygosity (LOH), resulting from gene mutation, chromosomal rearrangement – related to homologous recombination - chromosome breakage, or chromosome loss (Andrade et al., 2004). This bioassay makes use of several features that would make it a very suitable system for monitoring and analyzing samples contaminated with genotoxins from different sources. This test appraised environmental contamination, including airborne particulate matter, at two different sites on two dates in Mexico City (Delgado-Rodriguez et al., 1999) and was also applied to monitor the genetic toxicity of surface waters under the influence of urban and industrial discharges in the Caí river (Rio Grande do Sul, Brazil), proving its sensitivity to detect contamination from urban and industrial discharges.



In spite of this, the applicability of SMART to studies of genetic toxicity of environmental pollutants has not yet been documented to the same extent as it has been to the 400 and more chemical compounds already tested (Andrade et al., 2004). All in all, we employed the SMART in an attempt to reveal whether it is sufficiently sensitive to evaluate the impact of a possible environmental contamination – especially concerning the broad spectrum of genetics end points monitored.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Collection sites and sampling

In order to assess the genotoxicity of the Guaíba Hydrographic Region eight monitoring sites were chosen: (i) Caí, Taquari, Jacuí, Gravataí, Sinos Rivers, (ii) Dilúvio Brook, and (iii) two sites on Guaíba Lake – Guaíba past the mouth of Dilúvio (GAD) and Guaíba Gasômetro (GPC) – (Table I).

Water samples were collected in this area, according to Vargas et al. (1993). About one liter of surface water was collected at a distance of ~50 m downstream each point – stored at 4 °C for 4 days, and then divided into aliquots and kept in a freezer at -20 °C. Samples from all monitoring sites were collected in September 2000, August 2001, February 2002 and May 2003.

### 2.2. Physicochemical analyses

At the onset of each collection, pH, dissolved oxygen, conductivity and temperature from air and water were analysed. Measurements were made at each site at the same time, early in the morning (Table II).

### 2.3. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

#### 2.3.1. Strains

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

b. *flr<sup>3</sup> / In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Ba<sup>6</sup>*: The marker *flare<sup>3</sup>* (*flr<sup>3</sup>*, 3-38.8) is a recessive mutation that affects the shape of wing hairs, producing a trichome that has the shape of a flare. Due to their zygotic

lethality, these alleles are kept in stocks over balancer chromosomes carrying multiple inversions and a dominant marker that is homozygous lethal (*TM3, Bd<sup>S</sup>*).

c. High Bioactivation (HB) line: *ORR/ORR; flr<sup>3</sup>/ In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*. The ORR strain has chromosomes 1 and 2 from a DDT-resistant Oregon R(R) line, which are responsible for a high constitutive level of cytochrome P(CYP)6A2 (Hällstron and Blanck, 1985).

### 2.3.2. Culturing and treatment of tester strains

The genetic toxicity of Guaíba Hydrographic Region samples was accessed using two versions of the SMART: (i) Standard cross (ST): *flr<sup>3</sup>/ TM3, Bd<sup>S</sup>* females to *mwh/mwh* males; (ii) High Bioactivation cross (HB): *ORR/ORR; flr<sup>3</sup>/ TM3, Bd<sup>S</sup>* females to *mwh/mwh* males. Eggs from the two crosses were collected for 8 h on standard medium enriched with baker's yeast supplemented with sucrose. Three days later the larvae were transferred to vials containing 1.5 g of mashed potatoes (Yoki) rehydrated with 5 ml of the water samples. Negative control (distilled water) was always included. The treated individuals remained in the vials upon emergence of the surviving adult flies.

### 2.3.3. Scoring of Wings

Adult flies, *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* and *mwh +/ TM3, Bd<sup>S</sup>* genotypes, from both the ST, and HB crosses, were collected and stored in 70% ethanol. Their wings were mounted in Faure's solution and inspected under 400 X magnification for the presence of mosaic spots. On marker-heterozygous wings, two types of mutant spots could be observed: (i) single spots, either *mwh* and *flr<sup>3</sup>*, which can be produced by somatic point mutation, chromosome aberration as well as mitotic recombination, and (ii) twin

spots, manifest *flr* and *mwh* phenotypes in the same clone, which are originated exclusively from mitotic recombination. On balancer-heterozygous wings, *mwh* spots should reflect predominantly somatic point mutation and chromosome aberration, since products of mitotic recombination involving the TM3 chromosome and its structurally normal homologues are probably unviable.

#### *2.3.4. Statistical analysis*

To evaluate the statistical significance of the results obtained, we followed a multiple decision procedure of Frei and Würgler (1988), which makes four different diagnoses: positive, weakly positive, negative or inconclusive. The frequencies of each type of mutant clones per fly of a treated series were compared pair-wise (i.e., control vs. water samples) using the conditional binomial test of Kastembaum and Bowman (1970). Genotoxicity evaluation employed a two-fold rule where positive identification of genetic toxicity requires a total spot response two-fold greater than the negative control, without the requirement of a clear concentration-response relationship (Cunha et al., 2001; Tiburi et al., 2002).

### 3. RESULTS

The physicochemical characterization of the surface waters, made in situ, is summarized in Table II. Dissolved oxygen figures were not constant along the collection/sampling sites and in the different collection months. In the Gravataí and Sinos Rivers, as well as in the Dilúvio Brook, low values for critical dissolved oxygen were detected - 0.0 mgO<sub>2</sub>/l at Gravataí in February and May. Regarding conductivity, higher values in Dilúvio Brook were observed in all collections – the observation that higher conductivity and lower dissolved oxygen figures occurred concomitantly indicated an extremely degraded environment. Air and water temperatures were relatively constant along the monthly collections, although in August values above the expected ones were detected. For majority of the samples from September, August and February the pH values were slightly acid, as well as, in the samples from GAD, GPC, Gravataí and Dilúvio Brook in May was detected, but an alkaline pH also was measured in the May samples. However, the Spearman's correlation analysis revealed no statistically significance as regards genetic toxicity.

The water samples from Guaíba Hydrographic Region – collected in September 2000, August 2001, February 2002 and May 2003 - were assayed in two independent experiments with larvae from ST and HB crosses treated simultaneously under identical conditions. No differences between repetitions were observed. Therefore, the data were pooled and are shown in Table III, where the spot data are given for the *mwh/flr<sup>3</sup>* genotype. When a previous positive response was obtained in the marker-heterozygous flies, the balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were also analyzed. Significance testing was performed on the number of spots in treated groups and the corresponding concurrent negative controls. For each sample in each collection 3 904 000 cells were scored in both ST and HB crosses, which means an extensive sample size.

In analyses conducted with flies of the *mwh/flr<sup>3</sup>* genotype, only Caí and Jacuí water samples - collected in September 2000 - displayed significant increases in the frequencies of total spots. In Caí River these increments were observed in the ST cross, although for the Jacuí samples these increments were observed only for the HB cross. These data not only demonstrated that both samples were capable of damaging the DNA of *D. melanogaster* somatic cells, but also indicated that the samples from Caí and Jacuí Rivers contain, respectively, direct and indirect genotoxin. In an attempt to confirm and quantify the mutagenic and/or recombinagenic potential of these samples, we subsequently performed the analysis in the *mwh/TM3* flies. Although the frequency of total spots induced in this genotype was much lower than in the *mwh/flr<sup>3</sup>* flies, our results indicated that samples from Jacuí induced statistically significant increases in total spots, while samples from Caí did not cause any significant increment in the frequency of spots. This means that the genotoxins present in Jacuí samples not only act as indirect agents but also have the ability to induce both mutational and mitotic recombinational events. Concerning Caí samples the direct achievement was associated with homologous mitotic recombination, which is the primary cause of the significant increments observed in the SMART (Table III).

In relation to the samples collected in August 2001, positive responses were noticed in both Taquari and Caí Rivers. In these collection points, only the trans-heterozygous genotype in the ST cross exhibited statistically significant effects on the frequency of total spots, which makes the genotoxins present in these two samples elicit their effects on DNA by their direct and recombinagenic action.

The majority of the positive responses from Guaíba Hydrographic Region were observed in the summer collection, February 2002 - samples from Jacuí and Taquari Rivers and Dilúvio Brook, which were able to induce wing spots in the trans-heterozygous flies from ST cross. Since negative

outcomes were obtained in the balancer-heterozygous flies - these results are exclusively linked to direct recombinational events. Concerning the sample from Guaíba Lake (GPC), a positive response was observed in the HB cross and in the *mwh/flr<sup>3</sup>* flies, which means that the genetic toxicity of this point is related to indirect and recombinagenic genotoxins. The genetic toxicity figures for all samples collected in May 2003 did not show significant increases in any of the spot categories analyzed, revealing that they do not induce mutagenic and/or recombinagenic events in somatic cells (Table III).

#### 4. DISCUSSION

In this work the mutagenic and/or recombinagenic potential of several sites along the Guaíba Hydrographic Region were analyzed. Two positive results were observed in Caí River - September 2000 and August 2001 - linked to direct recombinagenic toxicants, which may be related to the principal environmental impact: the volume of domestic sewage disposal from Caxias do Sul area, in the mountain region. Additionally, the rugged relief of the region causes rainwater to flow promptly away instead of remaining for longer in that environment, consequently impeding the dilution of the residues. Although a series of experimental evidence pointed out urban wastewater to contain mutagenic agents with direct action on genetic material (Ohe et al., 2003), no literature data was available concerning the recombinagenic properties of these urban discharges. Concerning Jacuí samples, an indirect mutagenic and recombinagenic action was detected in the September 2000 collection and a direct recombinational activity was observed in February 2002. Particularly in the Lower Jacuí Basin, the major environmental impacts are caused by coal mining industry, as well as chemical, plastic, rubber, steel and food industries. The major environmental impacts on the Taquari River are the use of agricultural chemicals in the apple farms and the sewage disposal from the Northeastern Urban Agglomerate side by side with a natural water accumulation deficiency. The samples collected in August 2001 and February 2002 caused DNA rearrangements related to direct and recombinagenic toxicants. In the February 2002 collection, samples from Dilúvio Brook and Guaíba Lake (GPC) were able to induce wing spots by mitotic recombinagenesis – toxicants were proved to have a direct action in the first set of samples, although for the second one the observed increment in mitotic recombination depended on metabolic activation. The waters from Gravataí, Sinos, Caí and Jacuí Rivers flow into the Delta of the Jacuí, which forms the Guaíba Lake - the environmental impact in the



Lake is caused by untreated sewage runoff from the capital and from polluted waters of the Gravataí and Sinos Rivers, as well as from food, metallurgic and pulp industries. Additionally, Dilúvio Brook receives untreated domestic sewage discharges from the capital, and flows into the Guaíba Lake, contributing to severe environmental hazard in this region.

Collectively, mutagenicity evaluations of river waters provide an indication of the potential mutagenic hazard in the absence of a priori knowledge about the identity of the putative toxicants (Ohe et al., 2003). A number of studies of large rivers flowing through metropolitan areas have detected significant levels of surface water mutagenicity (Ohe et al., 2003; Isidori et al., 2004). It is always debatable whether the nature of chemicals or their hazardous effects are more important in risk assessment studies. Complexity of pollutants in natural samples like ours, however, provides an edge for hazardous effect over chemical analysis. Although the genotoxins detected in this study were not identified, the overall results suggest that the river waters flowing through metropolitan areas in Guaíba Hydrographic Region are contaminated with direct and indirect chemicals able to produce mitotic recombination and/or mutation. More important is the fact that all positive samples were identified as able to induce mitotic recombination – expressed basically by homologous recombination (Lehmann et al., 2003). In this context, progress in understanding the genotoxicity of water samples could be reached using SMART, since this assay, besides measuring mutational events – point and chromosomal mutations – is also able to distinguish homologous recombination (HR) in proliferative somatic cells. The standard strain of *Drosophila* has a basal level of cytochrome P450, although high bioactivation ones show increased P450 levels, specially the CYP6A2 – being particularly useful for testing polycyclic aromatic hydrocarbons, their nitro derivatives and other aromatic chemicals (Delgado-Rodrigues et al., 1999). When the same samples collected in September 2000 were analyzed by the

*Salmonella*/Microsoma assay (Villela, 2001), signs of point mutation in Jacuí and Caí in presence of metabolic activation were observed. In SMART the positive response associated to Caí is restricted to direct recombinagenic genotoxins, although for Jacuí mutational and recombinational events were responsible for the indirect genotoxicity observed. By comparing the data obtained in both tests, SMART seems to be more sensitive to detect genetic toxicity, since for both samples a two-fold statistically positive response was observed. In the Caí samples SMART was able to pick up the occurrence of homologous recombination - an event not detectable by Ames assay. Moreover, concerning Jacuí it was possible to identify recombinagenic and mutational events – the last one may be related not only to point mutation but also to aneugenic and/or clastogenic effects. The applicability of the SMART is reinforced by the demonstration that homologous mitotic recombination can result in loss of heterozygosity or genetic rearrangements, and that these events are involved in the genesis of numerous diseases, including cancer (Bishop and Schiestl, 2003). The evidence indicating that the major effect observed in this study is an increased frequency of recombination pointed out another risk that could be associated to water pollution – the increment in HR.

## **Acknowledgements**

We thank Companhia Petroquímica do Sul (COPESUL) for the technical assistance during the collections. This work was supported by the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

## 5. REFERENCES

- Andrade, H.H.R., Reguly, M.L., Lehmann, M., 2004. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), in: Henderson, D.S., (Ed.), *Drosophila Cytogenetics\_Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, pp 389-412.
- Bishop, A.J., Schiestl, R.H., 2003. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Exp. Mol. Pathol.*, 74, 94-105.
- Cunha, K.S., Reguly, M.L., Graf, U., Andrade, H.H.R., 2001. Taxanes: the genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 16, 79-84.
- Delgado-Rodriguez, A., Ortíz-Marttelo, R., Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S., Graf, U., 1999. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 39, 33-43.
- Frei, H., Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.* 203, 297-308.
- Hällstrom, I., Blanck, A.. 1985. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450 dependent reactions. *Chem.- Biol. Interact.* 56, 157-171.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., 2004. Integrated environmental assessment of Volturno River in South Italy. *Sci.Total Environ.* 327, 123-134.

Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.* 9, 527-549.

Lehmann, M., Franco, A., Vilar, K.S., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2003. Doxorubicin and its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 539, 176-175.

Ohe, T., White, P.A., DeMarini, D.M., 2003. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan áreas in North América. *Mutation Res.* 534, 101-112.

Pró-Guaíba, 2004. <http://www.proguaiba.rs.gov.br/>

Tiburi, M., Reguly, M.L., Schwartzmann G., Cunha, K.S., Lehmann, M., Andrade, H.H.R., 2002. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 51, 141-149.

Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Res.* 319, 31-45.

Villela, I., 2001. Avaliação genotóxica pelo teste *Salmonella*/Microsoma e determinação de contaminantes químicos de amostras de água superficial da Bacia do Guaíba. Master Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp 125.

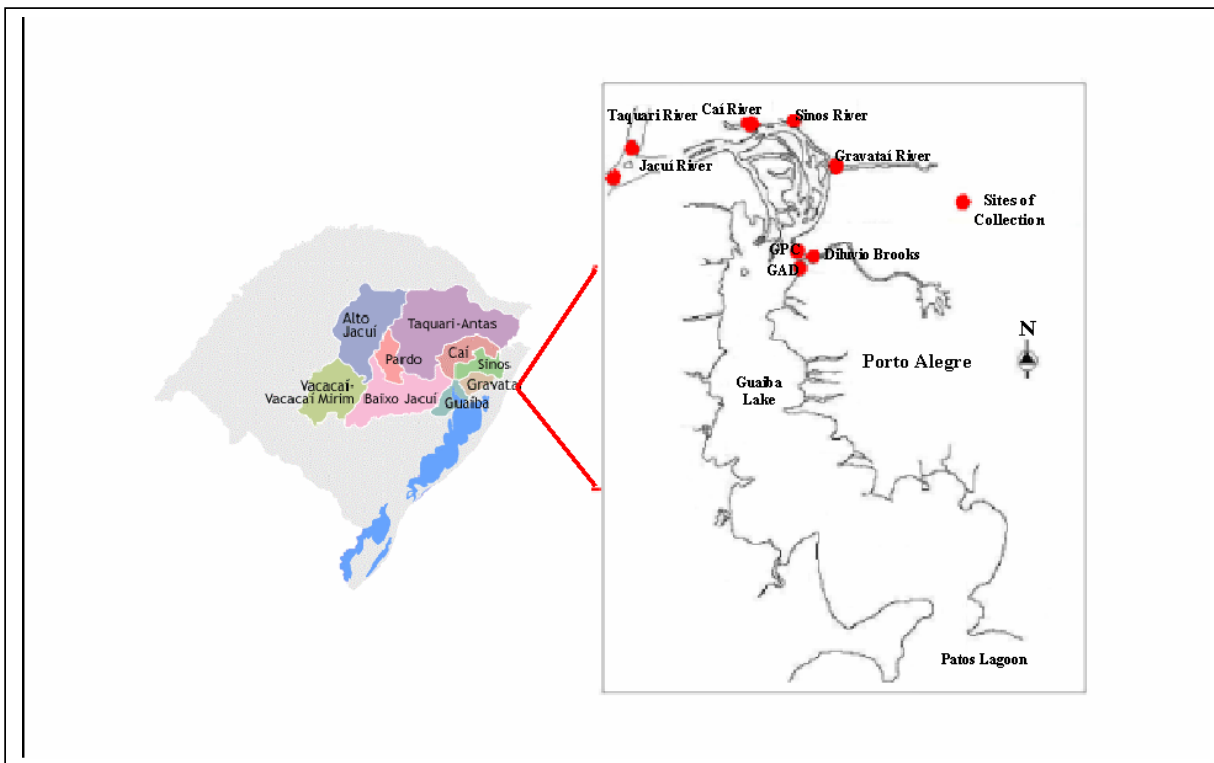


Figure 1. Geographic location of Guaíba Hydrographic Region and the diagram of the collection sites.

**Table I** Contributions from the sampling sites: urban, agricultural and industrial activities

SAMPLINGS	MAIN CONTRIBUTIONS
JACUÍ	Untreated urban discharge, agricultural pesticide plant, petrochemical plant, chemical and food industries.
CAÍ	Untreated sewage disposal from the plant industries, metallurgy and footwear factories, agricultural pesticide plant, and petrochemical.
GRAVATAÍ	Untreated urban discharge, agricultural pesticide plant, automobile, food and beverage industries.
GUAÍBA	Untreated sewage runoff, food, metallurgic and pulp industries.
SINOS	Agricultural pesticide plant, metallurgy, oil refinery, recycled paper plant and footwear metallurgical factories.
TAQUARI	Untreated sewage disposal, agricultural pesticide plant.
DILÚVIO BROOK	Untreated sewage runoff.

**Table II** Physicochemical analyses *in situ*.

	<b>GAD</b>	<b>GPC</b>	<b>GRAVATAÍ</b>	<b>SINOS</b>	<b>CAÍ</b>	<b>DILÚVIO</b>	<b>JACUÍ</b>	<b>TAQUARI</b>
<b>September</b>								
pH	6.63	6.83	6.29	6.42	6.92	6.84	6.20	6.92
Temperature Air (°C)	11.3	11.3	12.4	14.7	17.8	20.8	15.0	16.7
Temperature Water (°C)	17.9	17.8	16.9	16.8	15.0	20.2	16.6	16.2
Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	48.0	60.1	72.5	75.4	57.9	317.0	38.9	42.4
Dissolved Oxygen ( $\text{mgO}_2/\text{l}$ )	7.3	7.4	4.6	4.7	7.6	3.8	6.1	8.6
<b>August</b>								
pH	6.62	6.60	6.48	6.60	6.73	7.05	6.82	6.92



Temperature Air (°C)	20.3	20.3	22.4	23.7	22.6	29.8	23.5	20.1
Temperature Water (°C)	17.7	18.4	19.3	18.2	17.6	23.0	17.8	18.6
Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	12.2	84.9	137.3	145.0	104.0	419.0	54.5	59.5
Dissolved Oxygen ( $\text{mgO}_2/\text{l}$ )	6.8	6.8	0.9	3.7	8.3	1.2	10.3	9.9
<b>February</b>								
pH	5.5	5.6	6.1	6.5	5.8	6.2	6.3	6.3
Temperature Air (°C)	29.8	32.5	31.0	32.6	33.0	24.6	36.0	36.0
Temperature Water (°C)	29.3	30.8	32.3	33.6	29.4	25.1	29.4	29.4
Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	76.3	69.6	222.0	187.0	100.0	239.0	57.3	52.9
Dissolved Oxygen ( $\text{mgO}_2/\text{l}$ )	5.1	6.5	0.0	2.0	7.0	0.4	7.6	8.0

**May**

pH	6.0	5.6	6.5	8.9	10.1	6.2	8.7	8.4
Temperature Air (°C)	19.2	19.2	20.5	22.1	24.1	24.1	24.8	24.9
Temperature Water (°C)	17.9	18.2	18.6	17.3	17.2	18.6	17.9	22.1
Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	45.8	61.3	221.0	132.8	95.9	317.0	48.1	54.2
Dissolved Oxygen ( $\text{mgO}_2/\text{l}$ )	8.7	7.8	0.0	3.5	7.9	3.4	9.3	9.3

---

**Table III** Statistical significances – relative to distilled water control – of wing spot induction by Guaíba Hydrographic Region samples under urban, industrial and agricultural influence in ST e HB crosses.

Crosses and Genotypes	Sites of Collection	No. of flies (N)	Spots per fly (no. of spots)/statistical diagnosis <sup>a</sup>				Total <i>mwh</i> clones (n)
			Small single spots (1-2 cells) ( <i>m</i> = 2)	Large single spots (>2 cells) ( <i>m</i> = 5)	Twin spots ( <i>m</i> = 5)	Total spots ( <i>m</i> = 2)	

### ST Cross

SEPTEMBER 2000							
<i>mwh</i> / <i>flr</i> <sup>3</sup>	Distilled Water	40	0.85 (34)	0.08 (3)	0.00 (0)	0.93 (37)	37
	GPC	40	0.88 (35) -	0.25 (10) +	0.03 (1) i	1.15 (46) -	46
	SINOS	40	1.03 (41) -	0.18 (7) i	0.05 (2) i	1.25 (50) -	48
	GAD	40	0.95 (38) -	0.18 (7) i	0.00 (0) i	1.13 (45) -	45
	GRAVATAÍ	40	1.15 (46) i	0.08 (3) i	0.03 (1) i	1.25 (50) -	50
	Distilled Water	40	0.88 (35)	0.03 (1)	0.03 (1)	0.93 (37)	37

	DILÚVIO	40	1.08 (43) -	0.10 (4) i	0.03 (1) i	1.20 (48) -	48
	TAQUARI	40	0.80 (32) -	0.03 (1) i	0.05 (2) i	0.88 (35) -	35
	CAÍ	40	1.18 (47) -	0.10 (4) i	0.10 (4) i	1.38 (55) +	54
	JACUÍ	40	0.98 (39) -	0.10 (4) i	0.10 (4) i	1.18 (47) -	46
<i>mwh / TM3</i>	Distilled Water	40	0.40 (16)	0.03 (1)		0.43 (17)	17
	CAÍ	40	0.25 (10) -	0.05 (2) i		0.30 (12) -	12

### AUGUST 2001

<i>mwh / flr<sup>3</sup></i>	Distilled Water	40	0.85 (34)	0.13 (5)	0.08 (3)	1.05 (42)	42
	GPC	40	0.95 (38) -	0.13 (5) i	0.08 (3) i	1.15 (46) -	45
	SINOS	40	0.75 (30) -	0.15 (6) i	0.05 (2) i	0.95 (38) -	34
	GAD	40	0.75 (30) -	0.03 (1) -	0.00 (0) -	0.78 (31) -	31
	GRAVATAÍ	40	0.90 (36) -	0.10 (4) i	0.00 (0) -	1.00 (40) -	40
	Distilled Water	40	0.70 (28)	0.08 (3)	0.03 (1)	0.80 (32)	32
	DILÚVIO	40	0.53 (21) -	0.23 (9) i	0.10 (4) i	0.85 (34) -	34
	TAQUARI	40	1.13 (45) +	0.08 (3) i	0.03 (1) i	1.23 (49) +	49
	CAÍ	40	1.13 (45) +	0.08 (3) i	0.08 (3) i	1.28 (51) +	50

	JACUÍ	40	0.60 (24) -	0.15 (6) i	0.03 (1) i	0.78 (31) -	31
<i>mwh / TM3</i>	Distilled Water	40	0.68 (27)	0.03 (1)		0.70 (28)	28
	TAQUARI	40	0.63 (25) -	0.00 (0) i		0.63 (25) -	25
	CAÍ	40	0.60 (24) -	0.03 (1) i		0.63 (25) -	25

### FEBRUARY 2002

<i>mwh / flr<sup>3</sup></i>	Distilled Water	40	0.83 (33)	0.13 (5)	0.05 (2)	1.00 (40)	40
	GPC	40	1.00 (40) -	0.10 (4) i	0.03 (1) i	1.13 (45) -	44
	SINOS	40	1.13 (45) i	0.08 (3) i	0.05 (2) i	1.25 (50) -	50
	GAD	40	0.75 (30) -	0.15 (6) i	0.03 (1) i	0.93 (37) -	37
	GRAVATAÍ	40	0.93 (37) -	0.10 (4) i	0.03 (1) i	1.05 (42) -	42
	Distilled Water	40	0.65 (26)	0.08 (3)	0.00 (0)	0.73 (29)	29
	DILÚVIO	40	1.40 (56) +	0.08 (3) i	0.13 (5) +	1.60 (64) +	64
	TAQUARI	40	0.80 (32) -	0.28 (11) +	0.08 (3) i	1.15 (46) +	45
	CAÍ	40	0.63 (25) -	0.15 (6) i	0.05 (2) i	0.83 (33) -	32
	JACUÍ	40	1.00 (40) i	0.10 (4) i	0.03 (1) i	1.13 (45) +	44

<i>mwh / TM3</i>	Distilled Water	40	0.63 (25)	0.03 (1)		0.65 (26)	26
	DILÚVIO	40	0.43 (17) -	0.00 (0) i		0.43 (17) -	16
	TAQUARI	40	0.55 (22) -	0.05 (2) i		0.60 (24) -	24
	JACUÍ	40	0.60 (24) -	0.00 (0) i		0.60 (24) -	24

**MAY 2003**

<i>mwh / flr<sup>3</sup></i>	Distilled Water	40	0.85 (34)	0.20 (8)	0.05 (2)	1.10 (44)	43
	GPC	40	0.98 (39) -	0.03 (1) -	0.03 (1) i	1.03 (41) -	41
	SINOS	40	1.03 (41) -	0.10 (4) -	0.10 (4) i	1.23 (49) -	49
	GAD	40	1.13 (45) -	0.10 (4) -	0.00 (0) i	1.23 (49) -	49
	GRAVATAÍ	40	1.00 (40) -	0.08 (3) -	0.03 (1) i	1.10 (44) -	43
	Distilled Water	40	0.65 (26)	0.23 (9)	0.03(1)	0.90 (36)	34
	DILÚVIO	40	0.83 (33) i	0.13 (5) -	0.08 (3) i	1.03 (41) -	39
	TAQUARI	40	0.63 (25) -	0.15 (6) -	0.03 (1) i	0.80 (32) -	32
	CAÍ	40	0.78 (31) -	0.23 (9) i	0.03 (1) i	1.03 (41) -	40
	JACUÍ	40	0.98 (39) i	0.18 (7) -	0.03 (1) i	1.18 (47) -	47

**HB Cross**

<b>SEPTEMBER 2000</b>							
<i>mwh / flr<sup>3</sup></i>	Distilled Water	40	1.40 (56)	0.10 (4)	0.05 (2)	1.55 (62)	61
	GPC	40	1.28 (51) -	0.30 (12) +	0.08 (3) i	1.65 (66) -	65
	SINOS	40	1.38 (55) -	0.20 (8) i	0.03 (1) i	1.60 (64) -	64
	GAD	40	1.30 (52) -	0.25 (10) i	0.10 (4) i	1.65 (66) -	65
	GRAVATAÍ	40	1.28 (51) -	0.05 (2) i	0.03 (1) i	1.35 (54) -	54
	Distilled Water	40	1.38 (55)	0.10 (4)	0.10 (4)	1.58 (63)	63
	DILÚVIO	40	1.18 (47) -	0.13 (5) i	0.03 (1) -	1.33 (53) -	53
	TAQUARI	40	1.00 (40) -	0.15 (6) i	0.00 (0) -	1.15 (46) -	44
	CAÍ	40	1.33 (53) -	0.15 (6) i	0.00 (0) -	1.48 (59) -	59
	JACUÍ	40	2.00 (80) w+	0.25 (10) i	0.13 (5) i	2.38 (95) +	95
<i>mwh / TM3</i>	Distilled Water	40	0.83 (33)	0.03 (1)		0.85 (34)	34
	JACUÍ	40	1.33 (53) +	0.10 (4) i		1.43 (57) +	57

**AUGUST 2001**

<i>mwh / flr<sup>3</sup></i>	Distilled Water	40	1.25 (50)	0.23 (9)	0.08 (3)	1.55 (62)	61
	GPC	40	1.33 (53) -	0.20 (8) i	0.08 (3) i	1.60(64) -	64
	SINOS	40	0.95 (38) -	0.08 (3) -	0.10 (4) i	1.13 (45) -	45
	GAD	40	1.25 (50) -	0.28 (11) i	0.05 (2) i	1.58 (63) -	62
	GRAVATAÍ	40	1.05 (42) -	0.13 (5) -	0.03 (1) i	1.20 (48) -	48
	Distilled Water	40	1.40 (56)	0.18 (7)	0.05 (2)	1.63 (65)	65
	DILÚVIO	40	1.15 (46) -	0.20 (8) i	0.00 (0) i	1.35 (54) -	54
	TAQUARI	40	0.90 (36) -	0.13 (5) i	0.08 (3) i	1.10 (44) -	44
	CAÍ	40	1.05 (42) -	0.18 (7) i	0.10 (4) i	1.33 (53) -	53
	JACUÍ	40	0.90 (36) -	0.18 (7) i	0.00 (0) i	1.08 (43) -	43

### FEBRUARY 2002

<i>mwh / flr<sup>3</sup></i>	Distilled Water	40	0.75 (30)	0.08 (3)	0.05 (2)	0.88 (35)	35
	GPC	40	1.05 (42) i	0.25 (10) +	0.05 (2) i	1.35 (54) +	51
	SINOS	40	1.10 (44) i	0.05 (2) i	0.00 (0) i	1.15 (46) -	46
	GAD	40	0.98 (39) i	0.15 (6) i	0.05 (2) i	1.18 (47) -	46
	GRAVATAÍ	40	0.88 (35) -	0.10 (4) i	0.08 (3) i	1.05 (42) -	41



<i>mwh / TM3</i>	Distilled Water	40	0.90 (36)	0.00 (0)		0.90 (36)	36
	GPC	40	0.65 (26) -	0.00 (0) i		0.65 (26) -	26

<i>mwh / flr<sup>3</sup></i>	Distilled Water	40	0.98 (39)	0.20 (8)	0.08 (3)	1.25 (50)	50
	DILÚVIO	40	1.15 (46) -	0.25 (10) i	0.08 (3) i	1.48 (59) -	59
	TAQUARI	40	1.13 (45) -	0.15 (6) i	0.03 (1) i	1.30 (52) -	52
	CAÍ	40	1.08 (43) -	0.08 (3) -	0.10 (4) i	1.25 (50) -	50
	JACUÍ	40	1.23 (49) -	0.00 (0) -	0.05 (2) i	1.28 (51) -	51

### MAY 2003

<i>mwh / flr<sup>3</sup></i>	Distilled Water	40	1.13 (45)	0.10 (4)	0.05 (2)	1.28 (51)	51
	GPC	40	1.08 (43) -	0.08 (3) i	0.10 (4) i	1.25 (50) -	50
	SINOS	40	0.98 (39) -	0.08 (3) i	0.03 (1) i	1.08 (43) -	43
	GAD	40	1.38 (55) -	0.13 (5) i	0.08 (3) i	1.58 (63) -	63
	GRAVATAÍ	40	1.03 (41) -	0.05 (2) i	0.08 (3) i	1.15 (46) -	46
	Distilled Water	40	1.00 (40)	0.25 (10)	0.05 (2)	1.30 (52)	52
	DILÚVIO	40	1.08 (43) -	0.13 (5) -	0.03 (1) i	1.23 (49) -	48
	TAQUARI	40	0.90 (36) -	0.18 (7) -	0.05 (2) i	1.13 (45) -	45

CAÍ	40	1.45 (58) +	0.10 (4) -	0.10 (4) i	1.65 (66) -	66
JACUÍ	40	0.95 (38) -	0.05 (2) -	0.03 (1) i	1.03 (41) -	41

---

<sup>a</sup> Statistical diagnosis according to Frei and Würzler (1988): +: positive; -: negative; i: inconclusive; w+ weak positive; *m*: multiply factor; probability levels:  $\alpha = \beta = 0.05$ .

---

---

## Capítulo III

---

---

**Micronuclei Induced By Surface Water From Guaíba  
Hydrographic Region Using The Cytokinesis-Block  
Assay**

---

---

*Mutagenesis, enviado para publicação*

Manuscript for Mutagenesis

**MICRONUCLEI INDUCED BY SURFACE WATER FROM GUAÍBA HYDROGRAPHIC REGION USING THE CYTOKINESIS-BLOCK ASSAY**

**Viviane Souza do Amaral<sup>1</sup>, Alessandra Peres<sup>2</sup>, Ilan Maltz Turkienicz<sup>2</sup>, Nicole Delfim de Castro<sup>2</sup>, Paula Baumgardt<sup>3</sup>, Marialva Sinigaglia<sup>1</sup>, Maria Luiza Reguly<sup>1</sup> and Heloisa Helena Rodrigues de Andrade<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Mutagênese, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Biológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>3</sup>Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

\*Correspondence: Heloísa H. R. de Andrade, Laboratório de Diagnóstico da Toxicidade Genética – ULBRA, Prédio 22, 4º andar, Sala 25, Av. Farroupilha, 8001, 92420-280, Canoas, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 4779214.  
E-mail:heloisa@ulbra.br

## Abstract

The present study evaluates the clastogenic and/or aneugenic potential of 8 different sites along Guaíba Hydrographic Region (Rio Grande do Sul, Brazil) by analyzing micronuclei in human lymphocyte cultures (CBMN assay). A prevalence of positive responses was observed in the spring collection - September 2000. Almost all sites induced a significant increase -  $p < 0.05$  (Sinos, Caí, Gravataí and Taquari),  $p < 0.01$  (Guaíba Lake (GPC) and Dilúvio Brook),  $p < 0.001$  (Jacuí) - in MN frequency in relation to the negative control. Considering the collection of February 2002, a clastogenic and/or aneugenic activity for the water samples from Guaíba Lake - (GPC) ( $p < 0.01$ ) - Sinos ( $p < 0.05$ ) and Caí rivers ( $p < 0.01$ ) were identified. In autumn collection (May 2003) Guaíba Lake (GPC) exhibited a significant effect on the MN frequency ( $p < 0.05$ ). No significant elevation in the frequencies of MN in cultured human lymphocytes was observed in August 2001. According to the  $p$  values, the river water samples collected in spring and summer tend to be more mutagenic than those collected in winter and autumn. Moreover, as a whole ~ 35% (11/32) samples were classified as containing genotoxins acting as inductors of chromosomal alterations.

## 1. INTRODUCTION

Guaíba Hydrographic Region is located in the state of Rio Grande do Sul (Brazil), covering 84.763 km<sup>2</sup> and spreading onto 251 counties - about 6.5 million people inhabit this territory, the majority in urban (83.5%) and only 16.5% in rural areas. Nine hydrographic basins are responsible for more than 70% of the state's gross domestic product (Figure 1). The intense economic activity, mainly industrial and agricultural, has created a severe pressure upon the state's natural resources. The major environmental problems within the urban areas are the industrial contamination, the irregular waste disposal and the untreated sewage runoff into water streams. The pollution of agricultural chemical products, deforestation, lack of basic sewage treatment system and erosion are related to environmental damage in the rural areas (Pró-Guaíba, 2004).

The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* was first used to screen the mutagen pollution at eight sites in the Guaíba Hydrographic Region. Nearly 25% of the samples tested (8/32) showed genetic toxicity linked to direct and indirect toxicants, which was mainly related to homologous mitotic recombination - an end-point not yet associated to water (Amaral *et al.*, in preparation).

Among the various techniques used to estimate the genotoxicity of water samples under influence of the anthropogenic discharge, the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay is becoming an efficient tool for the measurement of DNA damage through observation of micronuclei in the interphase cells cytoplasm. This assay, based on cytokinesis inhibition by cytochalasin B (cyt-B), has facilitated micronucleous (MN) analysis exclusively in binucleated cells that have completed their first *in vitro* division after treatment with the test agent. The two basic phenomena leading to the formation of MN in mitotic cells are chromosome breakage and dysfunction of the mitotic apparatus. MNs are formed from acentric

chromosome or chromatid fragments and whole chromosome or chromatids that lag behind in anaphase and are left outside the daughter nuclei in telophase (Fenech, 2000; Kirsh-Volders *et al.*, 2002; Norppa *et al.*, 2003).

The outlining of this study focused on two specific points concerning the genotoxic assessment in the Guaíba Hydrographic Region. The first point centralized in the CBMN effectiveness as a tool for mutagenic screening in such a large water body. The second point focused on the comparison between CBMN and SMART data, which allows to obtain additional information concerning the type of lesions induced by mutagens, and their distribution in the basin.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Collection sites and sampling

In order to assess the genotoxicity of the Guaíba Hydrographic Region eight monitoring sites were chosen: (i) Caí, Taquari, Jacuí, Gravataí, Sinos Rivers, (ii) Dilúvio Brook, and (iii) Guaíba Lake – Guaíba past the mouth of Dilúvio (GAD) and Guaíba Gasômetro (GPC).

The river water samples were collected according to recommended methods for the examination of water (Vargas et al., 1993). About one liter of surface water was collected at a distance of ~50 m downstream each discharge - stored at 4°C for 4 days and then divided into aliquots and stored in a freezer at -20°C. For all monitoring sites the collections were done in September 2000, August 2001, February 2002 and May 2003.

### 2.2. Physico-chemical analyses

At the onset of each collection, pH, dissolved oxygen, conductivity and temperature from air and water were analysed. Measurements were made at each site at the same time, early in the morning (for additional information see, Amaral *et al*, in preparation).

### 2.3. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (CBMN)

#### 2.3.1. Donors, Cell Cultures, Treatment and Cell Harvesting

Peripheral blood was obtained once from three healthy donor females (aged 26, 28 and 32 years, referred to as donor 1, 2 and 3, respectively) with normal karyotypes. For each donor, one series of cultures was prepared with two parallel cultures for every river sample tested. For each culture, 0.8 ml heparinized blood was added to 8 ml RPMI-1640 medium (Sigma), containing 10% fetal calf serum, 1%



penicillin/streptomycin (Ceme) and 80µl phytohemagglutinin (10µl/ml) (PHA, Gibco). Twenty-four hours after post PHA stimulation, cultures were supplemented with 200µl of non-diluted water samples, which were previously sterilized in a Sartorius filter with a 0.22-mm pore membrane. The negative control was sterile distilled water and the positive control was 6 µg/ml of Bleomycin (Blenoxane from Bristol). Forty-four hours after PHA stimulation 6µg/ml cytochalasin B (Sigma) was added to the cultures to accumulate cells that had completed one nuclear division at the binucleated stage (Fenech, 2000). Blood cultures were incubated for a total of 72h at 37°C. The binucleated lymphocytes were harvested 28h after adding Cyt-B, hypotonic treatment was performed with 0.075 M KCl to lyse red blood cells and fixed with (3:1) methanol:acetic acid prior to transfer to slides and staining with Giemsa as recommended by Fenech, 2000.

### 2.3.3. Slides analysis

For each experimental sample, 3000 Giemsa-stained binucleated cells from two independent cultures were scored on coded slides in order to determine MN frequency according to the criteria proposed by Fenech *et al*, 2003.

As a parameter for cytotoxicity, the nuclear division index (NDI) was studied by screening 1000 cells per donor at 400X magnification for the frequency of cells with one, two, three or four nuclei. From these data the NDI was calculated according to the formula:

$$NDI=[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$$

where M1-M4 represents the number of cells with 1-4 nuclei and N is the total number of cells scored. Since nuclear divisions are asynchronous in CNMN blocked lymphocytes, cells with three nuclei can arise (Eastmond and Tucker, 1989; Rosefort *et al.*, 2004).

#### 2.3.4. *Statistical analysis*

The Student's *t*-test was used to statistically compare the frequencies of binucleated cells with micronuclei between water samples and negative controls. Level for statistical significance was  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

CBMN assay was performed in human lymphocyte cultures treated with water samples from Guaíba Hydrographic Region – collected in September 2000, August 2001, February 2002 and May 2003 - in line to evaluate the aneugenic and clastogenic potential of this hydrographic area.

#### 3.1. *Physico-chemical Analyses*

The physico-chemical characterization of the surface waters, made *in situ*, showed the dissolved oxygen figures were not constant along the collection/sampling sites and in the different collection months. Regarding conductivity, higher values in Dilúvio Brook were observed in all collections – the observation that higher conductivity and lower dissolved oxygen figures occurred concomitantly indicated an extremely degraded environment. Air and water temperatures were relatively constant along the monthly collections. For majority of the samples from September, August and February the pH values were slightly acid. However, the Spearman's correlation analysis revealed no statistical significance as regards genetic toxicity (data not shown).

#### 3.2. *Nuclear Division Index (NDI)*

This index showed no significant difference between the negative controls and the samples from the Guaíba Hydrographic Region in any of the samples, showing samples not to be cytotoxic to human lymphocytes (data not shown).

##### 3.1.2. *MN frequencies in negative and positive controls*

Baseline MN frequencies for negative control (distilled water) and for positive control (bleomycin), respectively - September ( $4.5 \pm 2.5$ ) and (22.0

$\pm 10.2$ ), August ( $4.7 \pm 2.2$ ) and ( $14.4 \pm 5.2$ ), February ( $3.7 \pm 2.5$ ) and ( $15.6 \pm 8.7$ ), May ( $4.7 \pm 2.2$ ) and ( $14.0 \pm 3.8$ ) - are in accordance with literature data previously published (Bonassi *et al.*, 2001; Rosefort *et al.*, 2004).

### 3.1.3. Genotoxicity of Water Samples

The major aim of the present study was to evaluate the clastogenic and/or aneugenic potential of samples collected at 8 different sites along Guaíba Hydrographic Region by observing micronuclei in human lymphocyte cultures (CBMN assay). Our *in vitro* experiments revealed positive responses prevailing in the spring collection - September 2000 (Table I). All sites, except Guaíba Lake (GAD), induced a significant increase -  $p \leq 0.05$  (Sinos, Gravataí, Taquari and Caí),  $p \leq 0.01$  (Guaíba Lake (GPC) and Dilúvio Brook),  $p \leq 0.001$  (Jacuí) - in MN frequency in relation to the negative control. The genotoxicity figures showed not only the ability of these water samples to induce chromosome breakage and/or loss in binucleated cells, but also that Jacuí exhibits a strong mutagenic potential *in vitro*. When the same samples collected in September 2000 were analyzed by the Salmonella/*Microsoma* assay (Villela, 2001), signs of point mutation in Jacuí, Caí - in presence of metabolic activation - and Sinos River - in absence of fraction S9 - were observed. The positive CBMN results for these sites indicate the presence of genotoxins with clastogenic and/or aneugenic potential in cultured human cells. Additionally, in SMART (Amaral *et al.*, in preparation) the genotoxicity associated to Caí is restricted to direct recombinagenic pollutants - an endpoint not detectable by Ames and CBMN assays. Moreover, concerning Jacuí it was possible to identify recombinagenic and mutational events - the last one may be related not only to point mutation, as revealed in Ames test, but also to aneugenic and/or clastogenic effects detected in the present study using CBMN technique.

Only the samples collected in August 2001, were classified as non-mutagenic – since no induced significant elevations of MN in cultured human lymphocytes was observed. Considering the collection of February 2002, a clastogenic and/or aneugenic activity for the water samples from Guaíba Lake - (GPC) ( $p \leq 0.01$ ) - Sinos ( $p \leq 0.05$ ) and Caí rivers ( $p \leq 0.01$ ) were identified. In autumn collection - May 2003 –Guaíba Lake (GPC) exhibited a significant effect on the MN frequency ( $p \leq 0.05$ ). According to the  $p$  values, the river water samples collected in spring and summer have a tendency to be more mutagenic than those collected in winter and autumn.

Considering that SMART was first used to make a preliminary screening of the mutagen pollution in this area, a comparison between data of both assays was applied to obtain additional information concerning the type of lesions induced by mutagens, and their distribution in the basin. Table II lists the CBMN and SMART data, according to their positive responses in the four seasons studied. The result demonstrated that there were indeed significant differences among the responses produced by these sampling sites in both CBMN and SMART – this means that the pollutants lead to diverse types of DNA-lesions, which represent different end points: (i) chromosomal mutation monitored by CBMN; and/or (ii) mutational and recombinational events detected by SMART. From the 11 samples classified as inductors of clastogenic and/or aneugenic events in CBMN only 3 - Jacuí, Caí (September 2000) and GPC (February 2002) – were classified as positive in the SMART: (i) Jacuí showed indirect mutation and recombinational action; (ii) Caí has its genotoxicity exclusively associated to its direct recombinational activity and (iii) GPC to indirect recombinational events. Moreover, as a whole, 19 samples were classified as containing genotoxins: 8 are positive in SMART and 11 in CBMN. Nearly 60% of the samples tested (19/32) were genotoxic in one or in both assays applied. GPC and Caí presented the highest ratio of positive results (4/19),

followed by Jacuí and Taquari (3/19), Sinos and Dilúvio (2/19), as well as Gravataí (1/19). The waters from Gravataí, Sinos, Caí and Jacuí Rivers flow into the Delta of the Jacuí, which forms the Guaíba Lake. The environmental impact in the Lake is caused by untreated sewage runoff from the capital and from polluted waters of the Gravataí and Sinos Rivers, as well as from food, metallurgic and pulp industries. Additionally, Dilúvio Brook receives untreated domestic sewage discharges from the capital city of the state, Porto Alegre, and flows into the Guaíba Lake, contributing to severe environmental hazard in this region.

In an attempt to confirm and quantify the mutagenic and/or recombinagenic potential of this basin, both methodologies make it possible to draw a more complete picture concerning the contamination by mutagens, their distribution and the potential effect on public health. All in all, both assays, CBMN and SMART, are sufficiently sensitive to evaluate the impact of a possible environmental contamination – covering a broad spectrum of genetic end points – which means that their association is recommended for the study of environmental samples potentially contaminated by complex mixtures.

## **Acknowledgements**

We thank Companhia Petroquímica do Sul (COPESUL) for the technical assistance during the collections. This work was supported by the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

#### 4. REFERENCES

Amaral VS, Medina-Silva R, Reguly ML, Andrade HHR (2005). Drosophila wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat. Res.*, no prelo.

Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 34-43.

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, **455**, 81-95.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S, and Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, **534**, 65-75.

Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., Decordier, L. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, **504**, 137-772.

Norppa, H and Falck C.-M. G. (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, **18**, 221-233.

Pró-Guaíba (2004). <http://www.proguaiba.rs.gov.br/>

Rosefort, C., Fauth, E., Zanki, H. (2004). Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, **19**, 277-284.



SEMA (2002). <http://www.sema.rs.gov.br/>

Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P. (1993). Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.*, **319**, 31-45.

Villela, I., 2001. Avaliação genotóxica pelo teste *Salmonella*/Microsoma e determinação de contaminantes químicos de amostras de água superficial da Bacia do Guaíba. Master Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp 125.



Fig. 1. Map of Rio Grande do Sul (Brazil) with the geographic location of Guaíba Hydrographic Region (SEMA, 2002. Elaboration: SCP/DEPLAN).



**Table I** – MN induction in human peripheral blood lymphocytes by different water samples from Guaíba Hydrographic Region.

Controls and Sites of Collection	MNCs <sup>a</sup> (mean ± SD)			
	September 2000	August 2001	February 2002	May 2003
Distilled Water	4.5 ± 2.5	4.7 ± 2.2	3.7 ± 2.5	4.7 ± 2.2
Bleomycin (6 µg/ml)	22.0 ± 10.2***	14.4 ± 5.2***	15.6 ± 8.7***	14.0 ± 3.8***
GAD	9.0 ± 5.7	9.7 ± 6.6	5.8 ± 4.9	4.7 ± 3.7
GPC	12.5 ± 5.9**	6.4 ± 4.6	10.7 ± 5.6**	12.8 ± 6.2*
Sinos	9.8 ± 4.3*	6.3 ± 2.2	9.2 ± 6.7*	6.4 ± 3.0
Gravataí	9.4 ± 4.4*	6.1 ± 4.5	6.4 ± 4.5	8.6 ± 4.9

<b>Dilúvio Brook</b>	17.0 ± 10.1**	3.9 ± 3.5	6.4 ± 4.1	4.6 ± 2.1
<b>Jacuí</b>	14.2 ± 4.7***	4.5 ± 3.2	6.4 ± 6.3	7.7 ± 3.6
<b>Taquari</b>	12.3 ± 8.3*	3.4 ± 1.9	3.2 ± 2.7	3.7 ± 1.6
<b>Caí</b>	8.3 ± 3.8*	5.1 ± 2.7	8.5 ± 4.3**	6.9 ± 6.7

---

<sup>a</sup>Number of micronucleated cells per 1000 binucleated cells; (mean ± S.D.) 3000 binucleated cells for each sample were scored.

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

**Table II** – SMART and CBMN data, according to their positive responses in the four seasons studied in different water samples from Guaíba Hydrographic Region.

SMART			CBMN	
<b>September 2000</b>				
<b>SAMPLES</b> Jacuí Caí	<b>ENDPOINT</b> Mutation and Recombination Recombination	<b>CROSS</b> HB cross ST cross	<b>SAMPLES</b> GPC, Sinos, Gravataí, Dilúvio, Jacuí, Taquari and Caí	<b>ENDPOINT</b> Chromosomal Mutation
<b>August 2001</b>				
<b>SAMPLES</b> Taquari Caí	<b>ENDPOINT</b> Recombination Recombination	<b>CROSS</b> ST cross ST cross	No positive response	
<b>February 2002</b>				
<b>SAMPLES</b> GPC Dilúvio Taquari Jacuí	<b>ENDPOINT</b> Recombination Recombination Recombination Recombination	<b>CROSS</b> HB cross ST cross ST cross ST cross	<b>SAMPLES</b> GPC, Sinos and Caí	<b>ENDPOINT</b> Chromosomal Mutation
<b>May 2003</b>				
No positive response			<b>SAMPLES</b> GPC	<b>ENDPOINT</b> Chromosomal Mutation

---

## **Capítulo IV**

---

# **Discussão Geral**

---

## 4. DISCUSSÃO GERAL

---

Recurso natural indispensável à vida, a água é um bem necessário e essencial para a sobrevivência das populações. No Brasil, até algumas décadas atrás, as grandes massas de água eram consideradas como reservatórios inesgotáveis, capazes de receber e absorver quantidades ilimitadas de rejeitos provenientes de diversas atividades humanas (Machado, 2003; Tundisi, 2003). Esta premissa errônea, associada ao significativo aumento no volume dos dejetos e a falhas no controle do tratamento dos rejeitos oriundos das atividades de origem industrial, rural e/ou urbana – levaram a um sério comprometimento tanto na disponibilidade quanto na qualidade das nossas fontes de água. Até hoje, muitas cidades brasileiras apresentam sistemas de esgotos mistos - nos quais os escoamentos cloacais e pluviais são drenados através da mesma via de descarte – ou ainda, em casos extremos, não possuem qualquer tipo de tratamento sendo diretamente lançados nos corpos d'água recipientes.

Esta situação pode ser observada no Rio Grande do Sul - em municípios com maior contingente populacional e concentração industrial - como é o caso das áreas metropolitanas de Porto Alegre e Caxias do Sul, localizadas na Região Hidrográfica do Guaíba. A contaminação da água desta região - decorrente, principalmente, do descarte sem controle de resíduos domésticos e industriais nos rios e do uso intenso de agrotóxicos nas zonas rurais – compromete o abastecimento de água potável para mais de um milhão de pessoas (Pró-Guaíba, 2004).

### 4.1 Diagnóstico da Toxicidade Genética

---

Na procura de um melhor entendimento das condições tóxico genéticas dos mananciais de água que fazem parte da Região



Hidrográfica do Guaíba foram escolhidos dois bioensaios: o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART) e o Teste de Micronúcleos por Bloqueio da Citocinese em linfócitos humanos (CBMN) - com várias particularidades que os tornam instrumentos sensíveis e informativos para o rastreamento de diferentes tipos de lesões genéticas.

O SMART detectando simultaneamente mutação gênica e aberrações cromossômicas, representadas por eventos aneugênicos e clastogênicos, assim como recombinação somática, utiliza como organismo experimental a *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1984) – um excelente modelo para estudar a genotoxicidade e seus mecanismos moleculares, podendo fornecer respostas relevantes, que podem ser extrapoladas para humanos (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; St. John e Xu, 1997). Esta última afirmativa está fundamentada na recente comparação dos dados obtidos através do Projeto Genoma Humano – com aqueles observados no programa equivalente desenvolvido com a *D. melanogaster* (Adams *et al.*, 2000)

O CBMN além de identificar mutações estruturais e numéricas, permite também explorar outros parâmetros genéticos tais como pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares – respectivamente indícios de instabilidade genômica e amplificação gênica – assim como a citotoxicidade associada à extensão e à progressão da divisão celular, através do Índice de Divisão Nuclear (Fenech, 2000). Outro ponto de fundamental importância, no emprego desta metodologia, está centrado na análise de danos genéticos em células humanas - o principal foco das Agências de Controle Ambiental.

#### **4.1.2 Teste SMART**

---

O presente trabalho avaliou, através do SMART de asa, o potencial mutagênico e/ou recombinogênico de amostras de água superficial de

diferentes pontos, situados ao longo da Região Hidrográfica do Guaíba, que estão sob influência de atividade agrícola, urbana e/ou industrial. As águas foram coletadas em setembro de 2000, agosto de 2001, fevereiro de 2002 e em maio de 2003, na foz dos rios Gravataí, Sinos, Caí, Jacuí e Taquari e do Arroio Dilúvio, assim como em dois pontos no próprio corpo recipiente, o Lago Guaíba – após a saída do Arroio Dilúvio (GAD) e na Ponta da Cadeia (GPC).

Dois resultados positivos foram observados no rio Caí, em setembro de 2000 e agosto de 2001. Estas respostas estão vinculadas à presença, nestas amostras, de genotoxinas com ação recombinogênica direta – que podem ser associadas ao grande volume de lançamentos de esgotos domésticos provenientes da região de Caxias do Sul, na serra gaúcha. Adicionalmente, o relevo acidentado da região dificulta o depósito da água da chuva, impedindo a diluição dos resíduos, ao mesmo tempo em que diminui a disponibilidade de água para as atividades agrícolas (FEPAM, 2004). Embora uma série de evidências experimentais indique que as genotoxinas presentes em efluentes de origem urbana interagem diretamente com o material genético (Langevin *et al.*, 1992; White e Rasmussen, 1998; Ohe *et al.*, 2003), não existem dados disponíveis na literatura a respeito das propriedades recombinogênicas deste tipo de descarga.

Já, no que se refere ao rio Jacuí, as amostras apresentaram comportamentos distintos dependentes das estações do ano em que foram realizadas as coletas. No verão observou-se um aumento exclusivo na frequência de recombinação mitótica no cruzamento padrão. Já na primavera, foi possível detectar acréscimos na atividade mutagênica (72%) e recombinogênica (28%) - em larvas com altos níveis de enzimas de metabolização. Particularmente na bacia do baixo Jacuí, o impacto ambiental é consequência da presença de indústrias de compostos químicos, de plástico, de borracha, siderurgia, petroquímica e produtos alimentares (FEPAM, 2004). Na bacia do Taquari, além da dificuldade de acumulação natural de água, há um

grande impacto causado tanto pelo uso de agrotóxicos na cultura da maçã, quanto pelo despejo de esgotos domésticos provenientes da região Nordeste do Estado (FEPAM, 2004). De fato, as amostras coletadas, neste rio, em agosto de 2001 e fevereiro de 2002, induziram rearranjos no DNA relacionados à presença de toxinas com ação recombinogênica direta, quando avaliadas através do SMART. Os resultados obtidos a partir da coleta de fevereiro de 2002 caracterizaram a genotoxicidade associada ao Arroio Dilúvio e ao Lago Guaíba (GPC) em função dos aumentos significativos na frequência total de manchas – relacionados especificamente à recombinação mitótica em células proliferativas de *D. melanogaster*. No primeiro caso, esta indução de permuta deve-se a genotoxinas de ação direta, enquanto que no segundo relaciona-se à pró-genotoxinas.

As águas dos rios Gravataí, Sinos, Caí e Jacuí desembocam no Delta do Jacuí, formando o Lago Guaíba - os principais impactos ambientais são o escoamento de esgotos de Porto Alegre e das águas poluídas dos rios Gravataí e Sinos, assim como de indústrias de celulose, produtos alimentícias e metalúrgicas. Adicionalmente, o Arroio Dilúvio é corpo recipiente de grandes lançamentos de dejetos urbanos não tratados provenientes da capital. Como suas águas desembocam no Guaíba, este arroio acaba por contribuir de forma significativa para os danos ambientais nesta região.

Quando as mesmas amostras coletadas em Setembro de 2000 foram avaliadas pelo ensaio *Salmonella*/Microsoma apenas o ponto de coleta localizado no Lago Guaíba, após a saída do Arroio Dilúvio (GAD), foi diagnosticado como mutagênico dependente de ativação metabólica – capaz de induzir mutações gênicas. Foram também observados indícios de mutação pontual no rio Jacuí e Caí – na presença de ativação metabólica – e no rio dos Sinos – na ausência da fração S9 (Villela, 2001). No SMART a resposta positiva associada ao Caí está restrita a atividade recombinogênica direta. Contudo, em relação ao Jacuí, cerca de 72% da toxicidade genética observada no SMART, em

larvas com alto nível de metabolização, deve-se a mutação e 28% relaciona-se à recombinação mitótica – colocando este bioensaio como uma ferramenta sensível capaz de fornecer um prognóstico preciso, referente tanto às lesões induzidas por mutação, quanto àquelas vinculadas à recombinação homóloga em células somáticas.

Coletivamente, o diagnóstico de amostras totais de água, dentro do contexto tóxico-genético, fornece indícios do potencial genotóxico dos rios na ausência de um conhecimento prévio a respeito da identidade das supostas genotoxinas presentes nestes ecossistemas (Ohe *et al.*, 2003). De fato, uma série de estudos, avaliando rios que fluem através de grandes áreas metropolitanas, detectou níveis significantes de mutagenicidade nestes corpos d'água (Ohe *et al.*, 1999; 2003; Kataoka *et al.*, 2000; Isidori *et al.*, 2004). Destaca-se, ainda, o fato de que as respostas obtidas permitem uma melhor extrapolação às condições ambientais, aliadas a menor probabilidade da ocorrência de artefatos gerados pelos processos de extração/concentração ou fracionamento, e a não eliminação dos efeitos interativos entre os diferentes compostos presentes nas amostras (Houk, 1992). Mesmo que as genotoxinas detectadas não tenham sido identificadas, os nossos resultados sugerem que as águas dos rios, que fluem através das áreas metropolitanas da Região Hidrográfica do Guaíba, estão contaminadas por compostos - com ação direta e indireta sobre o DNA – que atuam como recombinogênicos e/ou mutagênicos. Soma-se, ainda, o fato de que todas as amostras positivas foram identificadas como sendo capazes de induzir recombinação mitótica – expressa basicamente pela recombinação homóloga (Campesato *et al.*, 1997; Cunha *et al.*, 2002a; Cunha *et al.*, 2002b; Lehmann *et al.*, 2003). Dentro desta perspectiva, o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART) demonstrou ser um instrumento sensível e informativo para o rastreamento da genotoxicidade em amostras de água. Ainda que o SMART identifique eventos mutacionais - representados por mutação gênica e

cromossômica – o seu maior potencial vincula-se a ocorrência de recombinação homóloga. Um outro ponto importante, que ilustra a versatilidade deste teste, relaciona-se com a diagnose de agentes xenobióticos que requerem ativação metabólica dependente de citocromo P450. Com a construção de linhagens portadoras de alta atividade constitutiva de enzimas de metabolização, o SMART tornou-se efetivamente mais sensível na detecção de algumas classes específicas de substâncias, particularmente a dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e a dos seus nitro derivados (Delgado-Rodrigues *et al.*, 1995; Frölich and Würigler, 1990).

### 4.1.3 Teste CBMN

---

Dando continuidade as investigações referentes ao diagnóstico da toxicidade genética, tendo agora como enfoque principal a indução de eventos clastogênicos e/ou aneugênicos, foi empregado o Teste de Micronúcleos por Bloqueio da Citocinese em linfócitos humanos (CBMN) – para as mesmas amostras avaliadas no SMART: foz dos rios Gravataí, Sinos, Caí, Jacuí e Taquari, do Arroio Dilúvio, e Lago Guaíba – na Ponta da Cadeia (GPC) e após a saída do Arroio Dilúvio (GAD) cujas coletas ocorreram em setembro de 2000, agosto de 2001, fevereiro de 2002 e maio de 2003.

Através desta metodologia observa-se uma prevalência de respostas positivas na coleta da primavera, já que praticamente todos os pontos amostrados, exceto o Lago Guaíba na Ponta da Cadeia (GAD), apresentaram incrementos significativos nas freqüências de micronúcleos -  $p \leq 0,05$  (Sinos, Caí, Gravataí e Taquari),  $p \leq 0,01$  (Lago Guaíba (GPC) e Arroio Dilúvio),  $p \leq 0,001$  (Jacuí). O conjunto dos dados obtidos em setembro de 2000, evidenciou não apenas, a habilidade das genotoxinas presentes nestas misturas induzirem mutações cromossômicas em linfócitos humanos, mas também a maior atividade

mutagênica da amostra proveniente do rio Jacuí – considerando o menor valor de  $p$  observado (0,001).

Somam-se a estes achados os resultados previamente obtidos com o Teste de *Salmonella*/Microsoma, nos mesmos pontos coletados em setembro de 2000. Foram identificados indícios de eventos relacionados à mutação pontual no rio Jacuí e Caí – na presença de ativação metabólica – e no rio dos Sinos – na ausência da fração S9. Foi também encontrada resposta positiva, dependente de ativação metabólica, no Lago Guaíba - após a saída do Arroio Dilúvio (GAD) – relacionada à indução de mutações gênicas (Villela, 2001). No entanto, a toxicidade genética observada, por meio do ensaio CBMN, indicou que as genotoxinas nestas amostras, exceto as presentes no Lago Guaíba (GAD), atuam como indutoras de clastogênese e/ou aneugênese em cultura de células humanas. Finalmente, no SMART a genotoxicidade associada ao Caí está diretamente relacionada com a presença de compostos capazes de promover recombinação mitótica (Amaral *et al.*, submetido) – evento genético, não detectado pelos Testes de Ames e CBMN. Considerando a amostra do Jacuí (setembro de 2000), avaliada pelo SMART, identificou-se a presença de genotoxinas indutoras de recombinação homóloga e de mutação. Este último parâmetro deve estar associado não apenas a mutação gênica - observada através de indícios no Teste de Ames - mas, principalmente, a mutação cromossômica, em função dos resultados positivos detectados pela técnica do CBMN. Comparando-se as três abordagens experimentais, podemos inferir que o Jacuí, na coleta da primavera, foi o rio que apresentou uma maior complexidade, em termos de composição de genotoxinas – já que estas foram capazes de induzir mutação gênica, cromossômica e recombinação homóloga, em bactérias, insetos e em cultura de células humanas.

Por outro lado, em linfócitos humanos as amostras de agosto de 2001, foram caracterizadas como destituídas de ação mutagênica – ao contrário do obtido no SMART onde foram observadas respostas

significativas para os rios Taquari e Caí. Já em relação as amostras coletadas em fevereiro de 2002, foram obtidos acréscimos significativos nas freqüências de células micronucleadas para o Lago Guaíba (GPC -  $p \leq 0,01$ ), o rio dos Sinos ( $p \leq 0,05$ ) e o Caí ( $p \leq 0,01$ ). Finalmente, na coleta de outono – maio de 2003 – foi detectada apenas uma resposta positiva, restrita ao Lago Guaíba (GPC -  $p \leq 0,05$ ). Considerando os valores de  $p$ , pode-se inferir que na primavera e no verão as amostras de água da Região Hidrográfica do Guaíba tendem a ser mais mutagênicas que no inverno e no outono.

#### **4.1.4 Comparação da Eficiência dos Testes – SMART e CBMN**

---

Os dados obtidos com estes sistemas-teste apontaram para a toxicidade genética associada aos rios Caí, Jacuí, Taquari, Sinos, Gravataí, Lago Guaíba, na Ponta da Cadeia (GPC), e Arroio Dilúvio. Entretanto, os resultados apresentaram diferenças significativas entre as respostas detectadas no SMART e no CBMN – demonstrando que os poluentes ambientais induzem uma pluralidade de lesões no conteúdo informacional de células somáticas em proliferação. Dentre estes eventos tóxico-genéticos destacam-se: *(i)* mutação gênica e recombinação, detectada pelo SMART; e/ou *(ii)* mutação cromossômica também diagnosticada pelo CBMN. Como um todo, 19 amostras foram caracterizadas como indutoras de genotoxicidade: 8 no SMART e 11 no CBMN. Aproximadamente 50% dos pontos testados (16/32) apresentaram genotoxicidade em um ou em ambos os bioensaios empregados. Destaca-se, ainda, que as águas oriundas do Lago Guaíba (GPC) e do Caí, apresentaram o maior número de respostas positivas (4/19), seguido pelos rios Jacuí e Taquari (3/19), rio dos Sinos e Arroio Dilúvio (2/19), e rio Gravataí (1/19), (Tabela 1).





**Tabela 1** – Comparação dos dados obtidos nos Testes SMART e CBMN.

SMART			CBMN	
<b>Setembro de 2000</b>				
<b>Amostra</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Cruzamento</b>	<b>Amostra</b>	<b>Parâmetro</b>
Jacuí Caí	Mutação e Recombinação Recombinação	Aprimorado Padrão	GPC Sinos Gravataí Dilúvio Jacuí Taquari Caí	Mutação Cromossômica
<b>Agosto de 2001</b>				
<b>Amostra</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Cruzamento</b>		
Taquari Caí	Recombinação Recombinação	Padrão Padrão	Ausência de Genotoxicidade	
<b>Fevereiro de 2002</b>				
<b>Amostra</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Cruzamento</b>	<b>Amostra</b>	<b>Parâmetro</b>
GPC Dilúvio Taquari Jacuí	Recombinação Recombinação Recombinação Recombinação	Aprimorado Padrão Padrão Padrão	GPC Sinos Caí	Mutação Cromossômica
<b>Mai de 2003</b>				
<b>Amostra</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Cruzamento</b>	<b>Amostra</b>	<b>Parâmetro</b>
	Ausência de Genotoxicidade		GPC	Mutação Cromossômica

Tanto o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART) quanto o Teste de Micronúcleos por Bloqueio da Citocinese em linfócitos humanos (CBMN) mostraram ser instrumentos sensíveis e informativos para o rastreamento de agentes genotóxicos presentes em misturas complexas de origem ambiental. Entretanto, cabe ressaltar que o CBMN identificou como portadoras de atividade genotóxica 11 das 19 amostras analisadas, enquanto que no SMART somente 8 foram consideradas como portadoras de atividade tóxica genética. Ainda que no ensaio SMART estas amostras tenham mostrado potencialidades como indutoras de recombinação homóloga, apenas uma delas, a relacionada ao Jacuí (setembro de 2000) mostrou também atividade mutagênica (Tabela 1).

Também se destaca o fato de que dentre as 11 amostras classificadas como indutoras de eventos clastogênicos e aneugênicos no CBMN somente 3 - Jacuí e Caí (Setembro de 2000), assim como o Lago Guaíba (GPC) (Fevereiro de 2002) - foram diagnosticadas como positivas no SMART. As provenientes do rio Jacuí com ação indireta, dependente de aumento na atividade constitutiva de enzimas do tipo P450, e as originárias do rio Caí e do Lago Guaíba (GPC), com genotoxinas de ação direta - todas indutoras de recombinação homóloga entre os marcadores fenotípicos *mwh* e *flr<sup>3</sup>*. Desta forma pode-se concluir que estas 3 amostras, além de induzirem recombinação mitótica são também capazes de provocar lesões relacionadas à perda de fragmentos /e ou cromossomos inteiros (Tabela 1).

No presente estudo ambos os testes, SMART e CBMN, identificaram a genotoxicidade associada a esta Região Hidrográfica, em função do parâmetro genético para o qual cada um deles foi delineado, que permite o rastreamento de diferentes tipos de lesões. Ao mesmo tempo fica a indicação de que a utilização de diferentes bioensaios de curta duração é forçosamente o caminho para que se possa qualificar o potencial mutagênico e/ou recombinogênico, e,

conseqüentemente a qualidade dos sistemas aquáticos dos rios que constituem a Região Hidrográfica do Guarába.

A partir das evidências obtidas neste trabalho, pode-se inferir que o aumento na freqüência de recombinação homóloga, assim como de mutação cromossômica são os principais riscos genéticos associados a estas amostras de água. Evidências recentes têm sugerido que a recombinação homóloga (RH), assim como alterações cromossômicas são os principais processos de alterações genéticas envolvidos na gênese e progressão do câncer. Neste sentido, vários aspectos relacionados ao papel destes eventos na carcinogênese vêm sendo descritos. O primeiro deles refere-se à perda de heterozigose de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, através da indução de conversão gênica, deleção de segmentos cromossômicos e, em menor escala, translocações. O segundo, relaciona-se à demonstração de que indivíduos portadores de síndromes associadas a uma maior predisposição ao câncer apresentam altas taxas de RH. Neste caso, a RH não apenas causa incrementos nos eventos relacionados com a perda de heterozigose, mas também produz rearranjos genômicos aberrantes que, por sua vez, podem atuar na etapa de iniciação do processo carcinogênico. Além disso, a comprovação de que a RH está envolvida na manutenção dos telômeros - um processo intimamente relacionado com a imortalidade de algumas células tumorais - associada à comprovação de que danos oxidativos, induzidos por diferentes espécies reativas de oxigênio, contribuem de forma significativa para a ocorrência deste tipo de evento, reforçam o papel da recombinação homóloga na gênese do câncer (Bishop e Schiestl, 2003).



---

## **Capítulo V**

---

# **Bibliografia Geral**

---

## 5. Bibliografia Geral

---

Amaral VS, Medina-Silva R; Reguly ML, Andrade HHR (2005). *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat Res*, no prelo.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, *et al* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.

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

Artavanis-Tsacostas S, Matsumoto K, Fortini ME (1995) Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cell of *Drosophila melanogaster*. as measured in the wing spot test. *Environ Mol Mutagen* 34: 47-51.

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. *Mutat Res* 463: 33-51.

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

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

Bolognesi C, Landini E, Raggieri P, Fabbri R, Viarengo A (1999) Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ Mol Mutagen* 33: 287-292.

Bolognesi C, Morasso G (2000) Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends Food Sci Technol* 11: 182-187.

Campestrato VR, Graf, U, Reguly ML, HHR Andrade (1997) Recombinogenic activity of integerrimine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio brasiliensis*, in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 29: 91-97.

Carabias-Martinez R, Rodríguez-Gonzalo E, Fernández-Laespada ME, Calvo-Seronero L, Sánchez-San Román FJ (2003) Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Poll* 37: 928-938.

Chen DJ, Deaven LL, Meyne J, Okinaka RT, Strniste GF (1983) Determination of direct-acting mutagens and clastogens in oil shale retort process water. In: Waters MD, Sandhu SS, Lewtas J, Claxton L, Chernoff N, Nesnow S (eds) *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures, III*, Plenum Press, New York, pp. 269-275

Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res* 410: 237-243.

Cunha KS, Reguly ML, Graf, U, Andrade HHR (2001) Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolitic chemotherapeutic drugs in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 514: 95-103.

Cunha KS, Reguly ML, Graf U, Andrade HHR (2002) Comparison of camptothecin derivatives presently in clinical trials: genotoxic potency and mitotic recombination. *Mutagenesis* 17: 141-147.

De Boeck M, Kirsch-Volders M, Lison D (2003) Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat Res* 533: 135-152

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

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

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

Duan C-Q, Hu B, Jiang X-H, Wen C-H, Wang Z, Wang Y-X (1999) Genotoxicity of water samples from Dianchi Lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat Res* 426: 121-125.

Falck G-M, Hirvonen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliori L, Norppa H (1999) Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 441: 225-237.

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



Fenech M (1997) Advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 392: 11-18.

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81-95.

Fenech M, Morley AA (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147: 29-36.

Fenech M, Rinaldi J (1995) A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and nonvegetarians. *Carcinogenesis* 16: 223-230.

Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S (1999) Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14: 605-612.

Fenech M, Ferguson LR (2001) Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutat Res* 475:1-6.

FEPAM (2003) <http://www.fepam.rs.br/qualidade/guaiba/,asp>

FEPAM (2004) <http://www.fepam.rs.br/qualidade/guaiba/,asp>

Ferrari I (1991) Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabello-Gay MM, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R (eds) *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação*, SBG/Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.

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

Gauthier JM, Dubeau H, Rassart E, Jarman WM, Wells RS (1999) Biomarkers of DNA damage in marine mammals. *Mutat Res* 444: 427-439.

Gordon T, Browser D (2003) Beryllium: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat Res* 533: 99-105.

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

Graf U, Alonso Moraga A, Castro R, Diaz Carrillo E (1992) Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Fd Chem Toxic* 32: 423-430.

Graf U, Singer D. (1989) Somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster* (wing spot test): effects of extracts of airborne particulate matter from fire-exposed and non fire-exposed building ventilation filters. *Chemosphere* 19: 1094-1097.

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

Graf U, Würgler FE (1986) Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity tests. *Fd Chem Toxic* 24: 835-842.

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

Grassi MT (2001) As águas do planeta Terra. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, Edição Especial, pp 31-40.

Grover IS, Kaur S (1999) Genotoxicity of wastewater samples, sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. Mutat Res 426: 183-188.

Guecheva T, Henriques JAP, Erdtmann B (2001) Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with single-cell gel test (comet assay). Mutat Res 497 :19-27.

Guimmler-Luz MC, Erdtmann B, Balbuena RA (1992) Analysis of clastogenic effect of Porto Alegre drinking water supplies on mouse bone marrow cells. Mutat Res 279: 227-231.

Hartwig A (1995) Current aspects in metal genotoxicity. BioMetals 8: 3-11

Helleday T, Nilsson R, Jenssen D (2000) Arsenic [III] and heavy metal ions induce intrachromosomal homologous recombination in the *hprt* gene of V79 Chinese hamster cells. Environ Mol Mutagen 35: 114-122.

Houk VS (1992) The genotoxicity of industrial wastes and effluents. Mutat Res 277: 91-138.

Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella, A (2004) Integrated environmental assessment of Volturno River in South Italy. *Sci Total Environ* 327: 123-134.

Ji Q, Yang H, Zhang X (1999) *Vicia* root-micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Kui River near Xuzhou City, People's Republic of China. *Mutat Res* 426: 33-135.

Jonhson FM (1988) The genetic effects of environmental lead. *Mutat Res* 410: 123-140.

Josephy PD, Mannervik B, Montellano PO (1997) *Molecular Toxicology*. Oxford University Press, New York, 368p.

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

Kasprzak KS, Bal W, Porter K, Bialkowski (1999) Studies on oxidative mechanisms of metal-induced carcinogenesis. In: Dizdaroglu M, Karahaya AE (eds) *Advances in DNA Damage and Repair*. Kulver Academic Publishers, New York, pp.93-208

Kataoka H, Hayatsu T, Hietsch G, Steinkellner H, Nishioka S, Narimatsu S, Knasmüller S, Hayatsu H (2000) Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in te water of the Danube River. *Mutat Res* 466: 27-35.

Kaya B, Yanikoğlu A, Creus A, Marcos R (2000) Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 465: 77-84.

Kendall RJ (1992) Pesticide effects on terrestrial wildlife. *Environ. Sci. Technol* 26: 238-246.

Kirsch-Volders M (ed) (1997) The CB in vitro Micronucleus Assay in Human Lymphocytes. Special Issue, *Mutat Res* 392: Special Issue (1-2)

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

Kong MS, Ma TH (1999) Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. *Mutat Res* 426: 221-228.

Kong ZM, Zang Y, Wu QL (1998) Monitorin the genotoxicity of Lake Taihu, using two kinds of micronucleus tests. *Environ Poll* 99: 279-283.

Langevin R, Rasmussen JB, Sloterdijk HH, Blaise C (1992) Genotoxicity in water and sediment extracts from The St. Lawrence River, using the SOS chromotest. *Water Res* 26: 419-429

Lehmann M, Franco A, Vilar KS, Reguly ML, Andrade HHR (2003) Doxorubicin and its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 539: 176-175.

Lemos CT, Erdtmann B (2000) Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutat Res* 467: 1-9.

Machado CJS (2003) *Gestão das Águas: Apresentação*. *Ciência e Cultura* 55: 21-23.

Manahan SE (1997) Environmental Science and Technology. Lewis Publishers, New York.

McGeorge LJ, Louis JB, Atherholt TB, McGarrity GJ (1985) Mutagenicity analyses of industrial effluents: results and considerations for integration into water pollution control programs. In: Waters MD, Sandhu SS, Lewtas, Claxton L, Strauss G, Nesnow S (eds) Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures, IV, Plenum Press, New York, pp 247-268.

Mearns J, Dunn J, Lees-Haley PR (1994) Psychological effects of organophosphate pesticides: a review and call for research by psychologists. J Clin Psychol 50: 286-293.

Miao M, Fu R, Yang D, Zheng L (1999) *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong Province of the People's Republic of China. Mutat Res 426: 143-145.

Müller P, Stock T, Bauer S, Wolff I (2002) Genotoxicological characterization of complex mixtures. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. Mutat Res 515: 99-109.

Nebel BJ, Wright RT (2000) Environmental Science. 7<sup>th</sup> ed., Prentice Hall, New Jersey.

Norppa H (1997) Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. Environ Health Perspect 106: 829-835.

Ohe T, Takeuchi N, Sawanishi H, Hirayama T, Sugimura T, Wakabayashi (1999) Quantification of two aromatic amine mutagens, PBTA-1 and PBTA-2, in the Yodo River system. *Environ Health Perspect* 107: 701-704.

Ohe T, White PA, DeMarini DM (2003) Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. *Mutat Res* 53: 101-112.

Ono Y, Somiya I, Oda S (2000) Identification of a carcinogenic heterocyclic amine in river water. *Wat Res* 34: 890-894.

Osaba L, Aguirre A, Alonso A, Graf U (1999) Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 439: 49-61.

Pereira Netto AD, Moreira JC, Dias AEOX, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS, Barck J (2000) Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Química Nova* 23: 765-773.

Porter DW, Yakusshiji H, Nakabeppu Y, Sekigushi M, Fivash Jr MJ, Kasprzak KS (1997) Sensitivity of *Escherichia coli* (MutT) and human (MTH1) 8-oxo-dGTPases to in vitro inhibition by carcinogenic metals, nickel(II), copper(II), cobalt(II) and cadmium(II). *Carcinogenesis* 18: 1785-1791

Pro-Guaíba (2001) <http://www.proguaiba.rs.gov.br/>

Pró-Guaíba (2004) <http://www.proguaiba.rs.gov.br/>

Rajaguru P, Kalpana R, Hema A, Suba S, Baskarasethupathi B, Kumar PA, Kalaiselvi K (2001) Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana*

*hexadactyla*) measured using the comet assay. Environ Mol Mutagen 38: 316-322.

Rajaguru P, Vidya L, Baskarasethupathi B, Kumar PA, Palanivel M, Kalaiselvi K (2002) Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. Mutat Res 517: 29-37.

Ralph S, Petras M (1998) Caged amphibian tadpoles and *in situ* genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. Mutat Res 413: 235-250.

Rehana Z, Malik A, Ahmad M (1996) Genotoxicity of the Ganges water of Narora U.P.). Mutat Res 367: 187-193.

Reid TM, Feig DI, Loeb LA (1994) Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals. Environ Health Perspect 102: 57-61.

Rolla HC (1995) Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e lodo proveniente da indústria de papel e celulose. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 114p.

Rolla HC, Henriques JAP (1996) Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e lodo proveniente da indústria de papel e celulose. O Papel [s.l.] 11: 85-93.

Rolla HC, Henriques JAP (1997) Avaliação da atividade mutagênica de amostras de lodo provenientes da indústria de papel e celulose. O Papel [s.l.] 12:9 5-99.



Rossmann TG (1995) Metal mutagenesis. In: Goyer RA, Cherian GC (eds) Toxicology of Metals, Springer, New York, pp 373-403.

Sanchez-Galan S, Linde AR, Ayllon F, Garcia-Vazquez E (2001) Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 49: 139-143.

Shen J.H, Gutendorf B, Vahl HH, Shen L, Westendorf J (2001) Toxicological profile of pollutants in surface water from an area in Taihu Lake, Yangtze Delta. *Toxicology* 166: 71-78.

Siddiqui AH, Ahmad M (2003) The *Salmonella* mutagenicity of industrial, surface and ground water samples of Aligarh region of India. *Mutat Res* 541: 21-29.

Snow ET (1992) Metal carcinogenesis: mechanistic consideration. *Pharm Ther* 53: 31-65.

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

Steinkellner H, Kassie F, Knasmüller S (1999) *Tradescantia*-micronucleus assay of the clastogenicity of Austrian water. *Mutat Res* 426: 113-116.

Tundisi JG (2003) Gestão das Águas. Ciclo hidrológico e gerenciamento integrado. *Ciência e Cultura* 55: 31-33.

Ueda J, Takai M, Shimazu Y, Ozawa (1998) Reactive oxygen species generated from the reaction of copper (II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. *Arch Biochem Biophys* 356:231-239.

van Schaik N, Grant A, Rubenchik I, Graf U (1984) Use of *Drosophila* test systems for genotoxicity testing of herbal teas. *Immunol Hematol Res* 3: 199-202.

Vargas VMF (1992) Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 237p.

Vargas VMF, Motta VEP, Henriques JAP (1988) Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames test (*Salmonella/microsome*). *Rev Bras Genet* 11: 505-518.

Vargas VMF, Motta VEP, Henriques JAP (1993) Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res* 319: 31-45.

Vargas VMF, Migliavacca SB, Melo AC, Horn RC, Guidobono RR, Sá Ferreira ICF, Pestana MHD (2001) Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat Res* 490: 141-158.

Villela, I.(2001) Avaliação genotóxica pelo teste *Salmonella/Microsoma* e determinação de contaminantes químicos de amostras de água superficial da Bacia do Guaíba., Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 125p

Vogel EW, Zijlstra JA (1987) Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 182: 243-264.

Watanabe T, Takahashi Y, Takahashi T, Nukaya H, Terao Y, Hirayama T, Wakabayashi K (2002) Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Funkui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. *Mutat Res* 519: 187-197

White PA, Rasmussen JB, Blaise C (1996) Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. *Environ Mol Mutagen* 27: 116-139.

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

Würgler FE, Vogel EW (1986) *In vivo* mutagenicity testing using cells of *Drosophila melanogaster*. In: de Serres F.J. (ed.) *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, vol 10, Plenum Press, New York, pp 1-72.

Yu M-H (2001) *Environmental Toxicology*. Lewis Publishers, Boca Ratón, 255p.

Zeng D, Li Y, Lin Q (1999) Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People's Republic of China. *Mutat Res* 426: 159-161.