

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SAMUEL LIMA DE SANTANA

O ENSAIO COMETA EM *Drosophila melanogaster*
COMO BIOINDICADOR DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA
EM UMA ÁREA URBANA E RURAL

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SAMUEL LIMA DE SANTANA

O ENSAIO COMETA EM *Drosophila melanogaster*
COMO BIOINDICADOR DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA
EM UMA ÁREA URBANA E RURAL

Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para incremento da Disciplina Eletiva TCC.

Orientadora: Dra. Claudia Rohde

Coorientador: MSc. Cícero Jorge Verçosa

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2015

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

S231e Santana, Samuel Lima de.
O Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* como bioindicador da poluição atmosférica em uma área urbana e rural./ Samuel Lima de Santana. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.
32 folhas, il.; color.

Orientador: Claudia Rohde.
Coorientador: Cícero Jorge Verçosa
TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Licenciatura em Ciências Biológicas 2015.
Inclui bibliografia.

1. Poluição atmosférica. 2. Genotoxicidade ambiental. 3. Poluição urbana. I. Rohde, Claudia (Orientador). II. Verçosa, Cícero Jorge (Coorientador). III. Título.

363.739 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-062/2015

SAMUEL LIMA DE SANTANA

**O ENSAIO COMETA EM *Drosophila melanogaster*
COMO BIOINDICADOR DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA
EM UMA ÁREA URBANA E RURAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para incremento da Disciplina Eletiva TCC.

Aprovado em: 17/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Claudia Rohde
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão
Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Geórgia Fernanda Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Reginaldo Santana e Maria do Socorro Lima e às minhas irmãs Sumaya Lima e Rafaelly Lima, que estiveram sempre ao meu lado me incentivando e apoiando.

AGRADECIMENTOS

“Que darei eu ao SENHOR, por todos os benefícios que me tem feito?”

Salmos 116:12

A Deus, pela sua graça, bondade, por ter me dado saúde, disposição e energia para conquistar mais essa vitória.

A todos da minha família que sempre acreditaram no meu potencial. Em especial a meus pais, Reginaldo Santana e Maria do Socorro Lima, por me apresentarem o valor da simplicidade, e que em todo tempo me deram forças e incentivos para que hoje eu pudesse estar realizando meu sonho. Às minhas irmãs Sumaya Lima e Rafaelly Lima, que são grande parte da minha fonte de forças, que desde o começo de minha formação estiveram ao meu lado.

À minha querida orientadora Dra. Claudia Rohde, que não hesitou em abrir as portas do laboratório, recebendo-me de braços abertos, pela confiança, pela paciência e compreensão das minhas limitações, mostrando-se sempre disposta a ajudar. Ao meu coorientador, MSc. Cícero Jorge Verçosa, pelos ensinamentos, paciência e compreensão.

A todos do Laboratório de Genética do CAV/UFPE, em especial ao grupo da Mutagênese: André Silva, Érima Amorim e Robson Gomes. E àquele que esteve sempre presente nas minhas pesquisas, me ajudando e apoiando, Ícaro Castro, a ele um agradecimento especial.

À Universidade Federal de Pernambuco que me ofereceu oportunidade de concretizar a Licenciatura em Ciências Biológicas. A todos os professores da graduação que me passaram a vontade de manter elevados os ideais de minha profissão: Angélica Uejima, Carlos Perez, Dijanah, Kleber Andrade, Luiz Augustinho, Priscila do Carmo, Ricardo Neves, Ronaldo Celerino e Vanessa Leal.

Aos meus amigos de academia: Ábina Profiro, Ana Beatriz, Angelina Xavier, Erivaldo Alves, Iolanda Samara, Joelma Silvestre, Rafael Silva, Renê Souza e Robson Amorim com os quais pude desfrutar momentos de descontração, aprendizado, motivação e amizade. Obrigada por torcerem por mim e me incentivarem não só na vida profissional, mas em todos os assuntos. Aos meus

queridos amigos André Santos, Edson Francisco, Patrícia Vasco, Ricardo Sérgio, os quais estiveram sempre por perto, dividindo momentos alegres e dispostos a ajudar nos momentos difíceis. Deus na sua infinita sabedoria cruzou nossos caminhos, possibilitando esta amizade sólida, honesta e verdadeira. Sou muito grato por tê-los presentes em minha vida. Um agradecimento especial ao Leandro Luiz e a Natália Sena que cederam suas casas para que eu pudesse fazer a exposição dos organismos estudados.

Um agradecimento especial ao professor Francisco Amanajás pelo suporte no teste estatístico e ao Professor Sérgio Freitas pela colaboração nas traduções.

Enfim a todos que contribuíram direta ou indiretamente e acreditaram que esse momento chegaria. Muito obrigado a todos vocês.

“A sabedoria é muitas vezes mais útil aos outros do que àquele que a possui”

Eclesiastes 9: 11.

RESUMO

Afim de biomonitorar os poluentes ambientais, nas últimas décadas foram aplicadas diversas metodologias em organismos modelos, utilizados como biomarcadores de efeitos genotóxicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos. Foi objetivo deste estudo avaliar o potencial efeito da poluição atmosférica associada à urbanização, na genotoxicidade no organismo modelo *Drosophila melanogaster*, através do Ensaio Cometa. O local de estudo foi a cidade de Vitória de Santo Antão, em Pernambuco. A fim de investigar o possível efeito genotóxico da poluição atmosférica associada à urbanização, foram estudadas larvas do inseto *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) expostas por seis dias (do estágio embrião ao estágio larval) aos poluentes atmosféricos em uma área urbana e uma área rural do município. Os resultados foram comparados a um grupo controle negativo, exposto no mesmo período em uma área preservada, o Parque Nacional do Catimbau. Como metodologia de estudo foi aplicado o Ensaio Cometa com células de hemócitos obtidos de cerca de 60 larvas em terceiro estágio, para cada uma das três réplicas analisadas, em cada tratamento (ambiente rural, urbano e parque nacional). Os danos genéticos dos três grupos de tratamento foram classificados em quatro categorias, de zero (sem dano) a quatro (altamente danificado) de acordo com os padrões dos cometas formados. Os resultados foram analisados através do teste estatístico Mann-Whitney que demonstrou significativos danos genéticos nos organismos submetidos ao ambiente urbano de Vitória de Santo Antão, em comparação aos organismos expostos ao ambiente rural e ao Parque Nacional do Catimbau. Os resultados abrem perspectivas para que mais estudos sejam realizados sobre a poluição ambiental em ambientes urbanos, através da metodologia do Ensaio Cometa com o organismo modelo *D. melanogaster*.

Palavras-Chave: Genotoxicidade ambiental, hemócitos, linhagem *Oregon-R*, organismo modelo, Parque Nacional do Catimbau, Vitória de Santo Antão.

ABSTRACT

In order to biomonitoring environmental pollutants over the past decades they have been applied different methodologies models in organisms used as biomarkers of genotoxic effects, mutagenic and / or recombinogenic. Objective of this study was to evaluate the potential effect of air pollution associated with urbanization, in the genotoxicity of model organism *Drosophila melanogaster*, through the Comet Assay. The study site was the city of Vitoria de Santo Antão, Pernambuco. In order to investigate the possible genotoxic effects of air pollution associated with urbanization, were studied insect larvae *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) exposed for six days (stage embryo to larval stage) to air pollutants in an urban area and a rural area of the municipality. The results were compared to a negative control group, exposed in the same period a preserved area, the Catimbau National Park. Such as study methodology was applied Comet Assay with hemocytes cells obtained from about 60 larvae in the third stage, for each of the three replicates analyzed in each treatment (rural environment, urban and national park).The genetic damage of the three treatment groups (urban, rural and national park) were classified into four categories, from zero (no damage) to four (highly corrupt), according to the standards of comets formed. The results were analyzed using the Mann-Whitney statistical test that showed significant increase in genetic damage in organisms submitted to the urban environment of Vitória de Santo Antão, compared with organisms exposed to the rural environment and the national park. The results pointed towards that more studies be conducted on environmental pollution in urban environments, through the Comet Assay methodology with the model organism *D. melanogaster*.

Keywords: Environmental genotoxicity, hemocytes, Oregon-R strain, modelorganism, Catimbau National Park, Vitória de Santo Antão.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	17
Macho Adulto de <i>Drosophila melanogaster</i> .	
Figura 2.	19
A. Imagem da Avenida Mariana Amália- Centro de Vitória de Santo Antão. Fonte: Marcio Souza, Blog A Voz da Vitória B. Imagem do local de exposição dos organismos, evidenciando as três réplicas expostas na varanda do prédio (setas brancas).	
Figura 3.	20
A. Imagem de satélite da região de localização do Sítio Lagoa de Cabeço (Fonte: Google). B. Imagem do Sítio Lagoa de Cabaço.	
Figura 4.	20
Imagem do Parque Nacional do Catimbau, em Buíque, Pernambuco.	
Figura 5.	21
Imagem de uma caixa de população, elaborada para a exposição de drosofilídeos aos ambientes de estudo, confeccionada com garrafa PET transparente, tela fina, meio de cultivo no seu interior e uma cobertura para proteção (VERÇOSA, 2015).	
Figura 6.	24
Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético (0 a 4) baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. As imagens foram obtidas de leucócitos humanos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente, de acordo com Silva (2012).	
Figura 7.	27
Gráfico da ocorrência de danos genéticos (0 a 4) entre as três réplicas de cada experimento, e das suas médias, conforme Tabela 1 , para cada local investigado (área urbana, rural e Parque Nacional do Catimbau) e para o grupo controle negativo, de Verçosa (2015), cidade de Vitória de Santo Antão. A cor amarela e vermelha representam os danos mais intensos no DNA e que ocorreram em maior frequência na área urbana de Vitória de Santo Antão (Rua Mariana Amália).	

LISTA DE ABREVIACOES

- *D.* (*Drosophila*)
- DMSO(Dimetil Sulfoxido)
- DNA(cido Desoxirribonucleico, do inglês *DesoxyribonucleicAcid*)
- DF%(Frequência de Dano, do inglês *DamageFrequency*)
- IBGE(Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)
- ID (ndice de Dano, do inglês *Damage Index*)
- LM(Baixo Ponto de Fusão, do inglês *Low Melting Point*)
- mL(Mililitro)
- µL(Microlitro)
- Na₂HPO₄(Fosfato Dissódico de Potássio)
- pH (Potencial de Hidrognio inico)
- rpm (rotações por minuto)
- SMART (Teste de Mutação e Recombinação Somática, do inglês *Somatic Mutation and Recombination Test*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....26

Avaliação de *dano genético* (classificado de 0 a 4), *índice e frequência de danogenético* em três réplicas (e sua média) dos experimentos com larvas de *Drosophila melanogaster* (linhagem *Oregon-R*), expostas à poluição atmosférica de uma área urbana, e larvas expostas a uma área rural do município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Também são apresentados os resultados do grupo exposto ao Parque Nacional do Catimbau, em Buíque (uma área sem poluição urbana), além dos resultados *controle negativo* (três réplicas e média) realizado por Verçosa (2015), nas condições do Laboratório de Genética do CAV-UFPE.

Tabela 2.....28

Análise comparativa e níveis de significância (p) obtidos nas comparações dos resultados do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* expostos ao Catimbau, e área urbana e rural de Vitória de Santo Antão. Dados do controle negativo foram obtidos de Verçosa (2015).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 O DANO GENÉTICO.....	14
2.2 O ENSAIO COMETA PARA INVESTIGAÇÃO DO DANO GENÉTICO EM <i>Drosophila melanogaster</i>	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. METODOLOGIA.....	19
4.1 LOCAIS DE ESTUDO.....	19
4.2 EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS AOS AMBIENTES.....	21
4.3 ENSAIO COMETA.....	21
4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA E CONTAGEM.....	23
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO.....	30
7.REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

Define-se como mutação qualquer alteração no material genético que seja transferido à descendência celular (ROUSE & JACKSON,2013). Constantemente os organismos estão expostos a agentes que podem causar alguma lesão no DNA, desencadeando um potencial risco genotóxico e/ou carcinogênico. Neste sentido, entende-se como potencial genotóxico a capacidade de um agente alterar a integridade do material genético, causando algum dano, podendo esta lesão ser ou não reparada pelos diversos mecanismos de reparo presentes nas células. Já quando um agente for capaz de provocar ou estimular o aparecimento de câncer é considerado um agente carcinogênico (CIVETTA & CIVETTA, 2011).

O DNA pode ser alterado de diversos modos, seja por uma deleção, duplicação, translocação, erros no processo de transcrição da dupla fita de DNA, rompimento da fita simples ou dupla, que podem ser provocados por fatores endógenos ou exógenos.

O processo de mutação é uma importante fonte de variabilidade genética, que juntamente com o conteúdo genético original do organismo, permite que ele seja capaz de se adaptar às modificações e exigências do meio em que vive. Por outro lado, o processo de mutação pode também apresentar efeitos negativos, como surgimentos de tumores, aberrações, interrupção do ciclo celular e/ou bloqueios de vias metabólicas o que será prejudicial ao organismo (BARSINIÉ *et al.*, 2012).

O crescimento exponencial da população nos centros urbanos, associado ao crescimento industrial nas últimas décadas tem potencializado um aumento da poluição atmosférica, comprometendo a qualidade do ar (BAJPAYEE & DHAWAN, 2014). A liberação de poluentes e gases tóxicos pelas indústrias, pelos veículos motorizados e outras fontes, oferece um risco considerável para a genotoxicidade e/ou mutagenicidade aos organismos em geral, aumentando o índice de doenças respiratórias e outros problemas de saúde em populações humanas. Entre os poluentes atmosféricos com grande capacidade de lesionar o DNA estão os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs), os compostos metálicos e os materiais particulados (IARC, 1983; LEMOS *et al.*,2012).

Para a avaliação dos efeitos genotóxicos produzidos pela poluição associada à urbanização, foram desenvolvidas metodologias de biomarcadores de dano no

DNA, utilizando células de organismos modelos, como vertebrados ou invertebrados, em testes de mutagenicidade como o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART), o Teste de Micronúcleo, o Ensaio Cometa, entre outros.

O Ensaio Cometa, descrito por Ostling e Johanson (1984), e modificado por Singh *et al.* (1988), consiste em uma eletroforese em meio alcalino, para detecção das lesões no DNA da célula. Este teste demonstra uma alta sensibilidade para danos ao material genético, possibilitando o estudo com diferentes grupos animais, com uso de um pequeno número de células e é uma metodologia de baixo custo (COLLINS *et al.*, 2014). Esses benefícios fazem com que o Ensaio Cometa seja amplamente utilizado para análises tóxico-genéticas, biomonitoramento e reparo do DNA (OLIVE & BANÁTH, 2006).

O organismo modelo *Drosophila melanogaster* é bastante empregado nos mais diversos ramos da Biologia (Ecologia, Genética, Fisiologia, Desenvolvimento, Evolução, entre outros). Especialmente na Genética, há alguns anos tem sido empregado como um modelo para a investigação de diversos processos de desenvolvimento celulares, comuns de eucariotos superiores, incluindo seres humanos. Esse modelo biológico tem sido amplamente utilizado em testes genotóxicos como o teste SMART, e mais recentemente, no Ensaio Cometa, devido a seu rápido ciclo de vida, baixo custo, facilidade na manipulação laboratorial e na detecção de fenótipos, e ao grande conhecimento acumulado acerca de seu genoma. Além disso, a *Drosophila* é um modelo cada vez mais utilizado para o estudo de doenças humanas (REDLARSKI *et al.*, 2015).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O DANO GENÉTICO

Mutação ou dano genético se refere a qualquer alteração no material genético capaz de proporcionar novas combinações genéticas e, conseqüentemente, uma variabilidade genética. Quando as alterações no DNA não modificam a sequência de aminoácidos da proteína resultante e não afeta o funcionamento do organismo, seu efeito é considerado neutro. Porém, essa mutação pode exercer um efeito negativo no fenótipo, se provocar aparecimento de aberrações e tumores (SNUSTAD & SIMMONS, 2001) ou pode, ainda, provocar efeito positivo se trazer alguma

vantagem adaptativa ao indivíduo. Essas modificações podem ser provocadas através de uma deleção, adição, substituição na sequência de nucleotídeos do DNA, entre outras possibilidades. Por exemplo, as mutações podem ocorrer em um processo natural decorrente de falhas na replicação e de erros nas funções metabólicas, podem ser provocadas por lesões, por inserção de elementos transponíveis, por alterações tautoméricas (BROWN, 1999), como também podem ocorrer por um tratamento proposital ou pela exposição aos mais variados agentes mutagênicos (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

Os agentes genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos podem ser de natureza física e/ou química. Existem muitas substâncias químicas com efeito mutagênico, como a cafeína, que deriva da purina, que dependendo da dose pode causar quebras nos cromossomos de plantas e bactérias (NEHLIG & DEBRYB, 1994) ou o próprio pó de café que contém HAPs (CAMARGO & TOLEDO, 2012). Um exemplo de agente de natureza física é a temperatura que, quando alterada em alguns organismos, pode induzir perda de função de algumas enzimas. E relacionado aos fatores exógenos influenciando os riscos à integridade genômica, pode ser citada a radiação, dos tipos raio-X, alfa, beta e gama, que têm grande potencial para provocar alterações no material genético (SANCAR, *et al.*, 2004), assim como a poluição atmosférica.

Outro agente mutagênico é a poluição atmosférica, caracterizada pela liberação de compostos metálicos e outros contaminantes na atmosfera pela atividade produtiva das fábricas, dos motores dos veículos, da produção de fogo, equipamentos e outros, que são atividades comuns dos grandes centros urbanos. Grupos de populações humanas são capazes de induzir grandes alterações dos fatores bióticos e abióticos do ambiente onde vivem, em escalas e velocidade sem precedentes.

Em contato com os organismos, a poluição é capaz de modificar o material genético, mesmo ocorrendo em baixas concentrações, e provocar uma cadeia de eventos biológicos prejudiciais, tais como perturbações na reprodução, problemas respiratórios, inibição do crescimento, diminuição ou perda da função enzimática ou até mesmo surgimento de tumores (OHE *et al.*, 2004).

A poluição e o aquecimento global são algumas destas alterações que representam dois tipos de estresse (o químico e o termal, respectivamente) que

juntos contribuem para a fragmentação e destruição de ambientes naturais. Resultado disso é que as populações de organismo que habitam os grandes centros urbanos se tornam, pouco a pouco, menores e mais isoladas, e mesmo que sejam capazes de se adaptar, estão sujeitas à erosão e à deterioração de sua variabilidade genética original (FRANKHAM, 2005).

São os estudos de genotoxicidade ambiental que permitem a descrição dos impactos individuais da poluição sobre os organismos, podendo servir como sinais de alarme precoces ao risco de alteração no DNA (SILVA *et al.*, 2000; BARSINIÉ, *et al.*, 2012). Neste sentido, diversos ensaios foram desenvolvidos para identificar danos no material genético, provocados pela exposição dos organismos a agentes mutagênicos, com destaque ao Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART), o Teste de Micronúcleo, e o Ensaio Cometa, aplicado neste estudo.

2.2. O ENSAIO COMETA PARA INVESTIGAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

O Ensaio Cometa é um teste de genotoxicidade realizado em eletroforese em um meio alcalino que permite avaliar as alterações do DNA de células individuais. Essa metodologia foi descrita por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh *et al.* (1988). É um método eficiente na detecção de lesões de DNA em uma célula, além de rápido, muito sensível e de baixo custo (BELPAEME *et al.*, 1998). A fim de monitorar efeitos genotóxicos, alguns pesquisadores já utilizaram diferentes tipos de célula nucleada de diversos organismos, como mamíferos, humanos (GODSCHALK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2014; GAIVÃO & SIERRA, 2014), peixes, artrópodes, entre outros.

O modelo *Drosophila melanogaster* (**Figura 1**) está entre os organismos mais estudados em diversas áreas e, na última década, tem sido estudada também na área da genotoxicidade através do Ensaio Cometa (GAIVÃO & SIERRA, 2014; VERÇOSA, 2015). Sistemas-modelos de invertebrados como esta espécie são particularmente adequados para lidar com questões relativas à saúde humana. Embora evolutivamente separados, moscas e seres humanos compartilham mecanismos moleculares básicos, como os que são desencadeados em doenças neurodegenerativas (LENZ *et al.*, 2013).



Figura 1. Macho adulto de *Drosophila melanogaster*.

Um das vantagens da utilização deste organismo nos estudos é a facilidade, pouco espaço necessário e o baixo custo de manutenção em condições de cultivo em laboratório (GREENSPAN, 2004). Este organismo é um modelo valioso para todo o tipo de processos relacionados com a saúde humana, funcionando com um ótimo biomarcador para a resposta aos danos no DNA.

Biomarcadores são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental em nível individual, medido em um organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do *status* normal que não pode ser detectado no organismo intacto. Ou seja, são medidas de fluídos corporais, células, tecidos ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam, em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, compartimentais ou energéticos, a presença de substâncias contaminantes ou a magnitude da resposta do organismo alvo (ARIAS *et al.*, 2007). O Ensaio Cometa empregando *D. melanogaster* como modelo experimental é uma prática recente e muito promissora, já tendo sido aplicada em estudos com células do cérebro, do intestino médio, da hemolinfa, da glândula salivar e do disco imaginal de larvas (GAIVÃO & SIERRA, 2014).

Entender como contaminantes afetam os parâmetros genéticos populacionais pode oferecer informações importantes sobre as consequências da exposição no nível da população das espécies analisadas (MUSSALI-GALANTE *et al.*, 2014), e este estudo pretende contribuir neste sentido.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito de genotoxicidade produzida pela poluição atmosférica associada à urbanização, no organismo modelo *Drosophila melanogaster*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos genotóxicos da poluição atmosférica em um ambiente urbano e rural do município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, empregando células somáticas da hemolinfa de larvas de *Drosophila melanogaster*;
- Comparar os possíveis efeitos genotóxicos da poluição urbana a dois ambientes distintos, uma área rural e uma área preservada;
- Comparar os resultados de genotoxicidade deste estudo a outras metodologias empregadas com o mesmo organismo, em outros locais e com outras abordagens, a fim de estabelecer parâmetros e consolidar cada vez mais a metodologia do Ensaio Cometa.

4. METODOLOGIA

4.1 LOCAIS DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Vitória de Santo Antão, que está inserido em uma área de 372.637 km² e distante 55 km da cidade do Recife, capital do estado de Pernambuco. O município está localizado na mesorregião da Zona da Mata pernambucana. Limita-se com os municípios de Glória do Goitá, Pombos, Moreno, Escada e Cabo de Santo Agostinho. Segundo o último senso do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), a população vitoriense foi estimada em 134.871 habitantes, com aproximadamente 87,2 % da população vivendo na área urbana do município (5.717 km²)

Dois locais foram investigados no município de Vitória de Santo Antão, sendo um denominado de área **urbana** e o outro, **ambiente rural**. E como local controle negativo, foi escolhida uma **área preservada (Parque Nacional do Catimbau)**. Segue a descrição dos locais:

- **Área urbana:** Situada na Avenida Mariana Amália, n°444, no Centro de Vitória de Santo Antão, a 146m de altitude (coordenadas 08°07'17.3"S// 35°17'41,1"O) que representa um local de intenso trânsito de veículos, onde foram expostos os indivíduos adultos da linhagem *Oregon-R* de *Drosophila melanogaster* (**Figura 2**). Os drosofilídeos foram expostos neste local entre os dias 25 de abril e 01 de maio de 2015.



Figura 2. **A.** Imagem da Avenida Mariana Amália- Centro de Vitória de Santo Antão. Fonte: Marcio Souza/Blog A Voz da Vitória **B.** Imagem do local de exposição dos organismos, evidenciando as três réplicas expostas na varanda do prédio (setas brancas).

- **Área rural:** Situada no Sítio Lagoa de Cabeço, na Zona Rural de Vitória de Santo Antão, a 183m de altitude (coordenadas 08°06'55.1"S // 35°20'11.5"O), uma propriedade privada com moradia e cultivo de subsistência (**Figura 3**). Os drosofilídeos foram expostos neste local entre os dias 13 e 19 de abril de 2015.

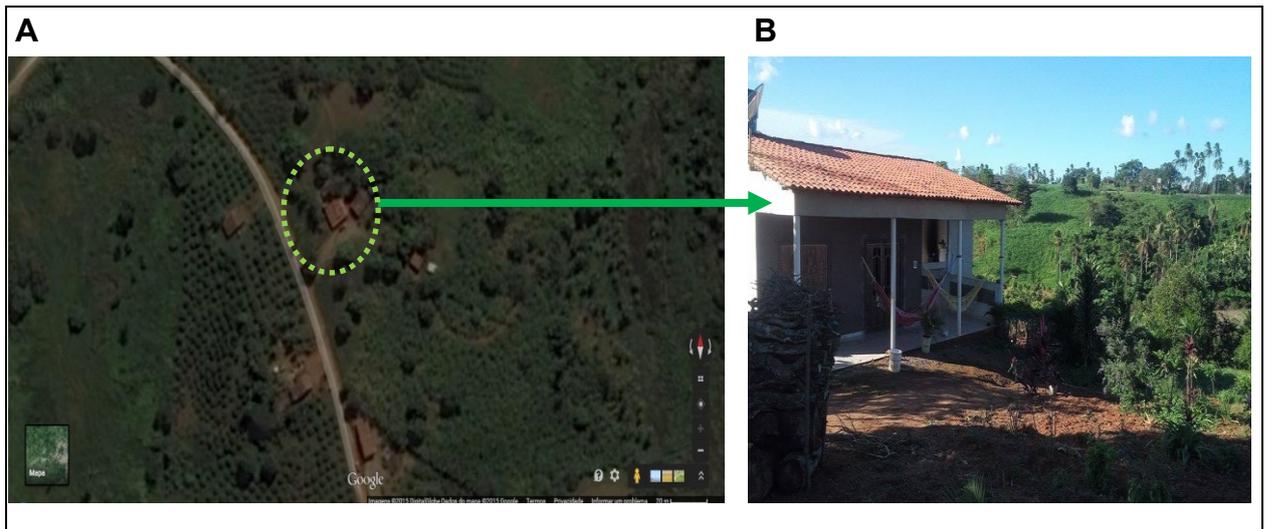


Figura 3. A. Imagem de satélite da região de localização do Sítio Lagoa de Cabeço (Fonte: Google). B. Imagem do Sítio Lagoa de Cabeço.

- **Área preservada:** Como área sem poluição foi escolhido o Parque Nacional do Catimbau, distante 242 km de Vitória de Santo Antão, em sentido Oeste, situado na mesorregião do Agreste pernambucano, a 798m de altitude (coordenadas 08°24'00"S// 37°09'30"O). Esta Unidade de Conservação Federal é, no momento, o único Parque Nacional situado no trecho continental do estado (**Figura 4**). Os drosofilídeos foram expostos neste local entre os dias 13 e 19 de abril de 2015, o mesmo período da **área rural**, pelo aluno de mestrado Ícaro F. A. Castro.



Figura 4. Imagem do Parque Nacional do Catimbau, em Buíque, Pernambuco.

4.2 EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS AOS AMBIENTES

Nos locais de estudo os indivíduos adultos de *D. melanogaster* foram expostos em três caixas de população, denominadas de triplicatas, construídas com garrafas PET segundo especificações de Verçosa (2015) (**Figura 5**).



Figura 5. Imagem de uma caixa de população, elaborada para a exposição de drosofilídeos aos ambientes de estudo, confeccionada com garrafa PET transparente, tela fina, meio de cultivo no seu interior e uma cobertura para proteção (VERÇOSA, 2015).

Para confecção das caixas de populações foram utilizadas garrafas PET de dois litros, que foram cortadas em 15 cm na parte anterior e posterior onde foi posta uma tela para que os drosofilídeos pudessem obter contato com o ar e, conseqüentemente, com os agentes atmosféricos presentes no ambiente.

Cerca de 120 indivíduos foram colocados em cada caixa, e estas ficaram suspensas em local sombreado, durante seis dias, nos locais. No interior das mesmas havia meio de cultura para manutenção dos indivíduos adultos e suas larvas descendentes. Os adultos foram alimentados a cada dois dias com fermento líquido e o meio foi hidratado com água destilada misturada ao fermento. Após seis dias de exposição os organismos foram encaminhados ao Laboratório de Genética da UFPE-CAV, onde foram realizadas as etapas do Ensaio Cometa.

4.3 ENSAIO COMETA

Para o estudo foi utilizado o método Ensaio Cometa com células da hemolinfa (hemócitos) de larvas de *Drosophila melanogaster* da linhagem *Oregon-R*, mantida há várias gerações em condições de endocruzamento e cultivo em laboratório. As larvas foram descendentes dos adultos mantidos nas caixas de populações, e se

desenvolveram nos ambientes do estudo, expostas as condições atmosféricas desde sua fase de embrião. O Ensaio Cometa seguiu os passos descritos a seguir:

Extração de hemolinfa

Foram extraídos hemócitos de 60 larvas, que constituíram uma réplica do experimento. Em cada local de estudo, três réplicas foram submetidas ao teste, totalizando um *pool* de hemócitos de 180 larvas, por cada local.

De cada réplica, 60 larvas foram colocadas em uma placa de Petri e em seguida resfriadas a 4°C por um minuto, para diminuir a taxa metabólica e facilitar sua manipulação. Passado um minuto, cada larva foi, individualmente, transferida para um poço de uma placa escavada Kline (de 12 poços), contendo solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para evitar a coagulação da hemolinfa. Para exposição da hemolinfa, as larvas foram cortadas lateralmente com a ajuda de um bisturi (utilizado para procedimentos cirúrgicos), uma pinça de relojoeiro nº 5 e um microscópio estereoscópico (lupa).

Com ajuda de uma micropipeta a hemolinfa depositada na placa Kline foi colhida e transferida para um microtubo de 1,5 mL. O tubo, contendo a solução de EDTA e a hemolinfa, foi centrifugado duas vezes a 3.000 rpm por 3 minutos, e descartado 100 µL do sobrenadante. Para completar o volume do tubo foi acrescentado mais 100 µL de EDTA, e submetida a mais uma centrifugação.

Preparação das soluções

Para realização do Ensaio Cometa foram preparadas previamente algumas soluções de uso e estoque, como Gel de agarose de baixo ponto de fusão (LM); Gel de agarose padrão; solução de EDTA; solução de hidróxido de sódio (NaOH); tampão fosfato alcalino (PBS). Outras soluções foram preparadas exclusivamente no momento do teste, como a Solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1 M NaOH, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, e 10% DMSO) ajustada para pH 10, e o Tampão de eletroforese (1M NaOH, 200 mM EDTA) ajustado para pH > 13.

Montagem das lâminas

Lâminas histológicas foram previamente lixadas na face superior para facilitar a adesão da agarose à lâmina. Em seguida foram lavadas com água e detergente e secas em álcool.

Após a coleta de 60µL da suspensão da hemolinfa das larvas de *D. melanogaster* o material foi homogeneizado em 100 µL de solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM) a 37°C. Por se tratar de uma etapa fotossensível, esse procedimento foi realizado na ausência de luz. O homogeneizado foi aplicado em lâminas previamente banhadas em agarose padrão. Uma lamínula (24 mm x 60 mm) foi colocada sobre o material. Para solidificar a agarose, as lâminas foram submetidas a 4°C por 10 minutos. Passado esse tempo as lamínulas foram retiradas e as lâminas com o material biológico foram imersas em solução de lise e mantidas a 4°C por 72 h.

Ao término do período de lise celular, as lâminas foram submetidas por 20 minutos a uma solução tampão a 4°C a fim de desnaturar o material genético. Em seguida foi realizada a corrida de eletroforese por 20 minutos a 40 V/cm e 300 mA. Passado a corrida as lâminas foram recolhidas e postas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos. Após a neutralização, as lâminas foram fixadas, sendo imersas em etanol absoluto por 5 minutos, e armazenadas a 4°C até o momento da análise microscópica.

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA E CONTAGEM

As lâminas foram coradas com 50 µL de GelRed™ diluído em água destilada na proporção de 1:500 e observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2) com filtro AlexaFluor 546, no aumento de 40x. Foi observado um total de 100 nucleóides, sendo 50 em cada lâmina analisada.

Os cometas contabilizados foram avaliados a partir de dois parâmetros: o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%). O ID classifica os cometas em cinco classes, da classe 0 a classe 4, de acordo com o comprimento da cauda e a intensidade (**Figura 6**). Na classe 0 estão os cometas considerados intactos, ou seja, sem danos causados pela exposição; a classe 1 corresponde a cometas com

danos mínimos; classe 2 a cometas com danos médios; classe 3 a cometas com danos intensos; e a classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos. Os valores obtidos através do ID para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4). Assim, o índice de dano total foi calculado através da seguinte fórmula: **$ID\ total = 0.(n^\circ\ de\ cometas\ classe\ 0) + 1.(n^\circ\ classe\ 1) + 2.(n^\circ\ classe\ 2) + 3.(n^\circ\ classe\ 3) + 4.(n^\circ\ classe\ 4)$** .

O segundo parâmetro, FD%, foi calculado como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de cometas contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total). Neste caso, foi aplicado o seguinte cálculo: **$frequência\ de\ dano = [(n^\circ\ total - n^\circ\ classe\ 0).100] / n^\circ\ total$** .

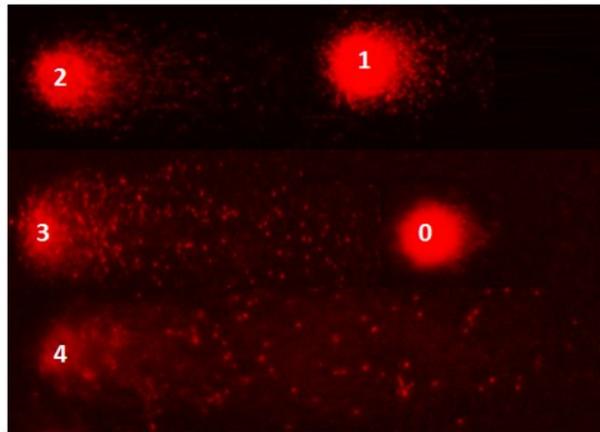


Figura 6. Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético (0 a 4) baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. As imagens foram obtidas de leucócitos humanos, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente, de acordo com Silva (2012).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste não paramétrico U de Mann-Whitney, uma vez que não foi possível demonstrar uma distribuição dos resultados. Foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 1.5. O teste de Mann-Whitney é apropriado para averiguar se as médias de duas populações contínuas e independentes são iguais. As duas amostras envolvidas não têm que ter a mesma dimensão, entretanto todas as amostras deste estudo tinham a mesma dimensão, ou seja, 100 células em cada réplica.

O teste U foi aplicado para comparar as amostras duas a duas, tanto por cada réplica (denominadas réplicas 1, 2 e 3), totalizando 100 amostras de cada amostra; quanto para o total obtido nas três réplicas (300 amostras de cada amostra).

Os resultados de significância (p) das comparações foram incluídos em uma tabela comparativa. Valores obtidos de $p \leq 0,05$ indicam que *há diferenças significativas* no nível de mutagênese entre as amostras, provavelmente devido à poluição atmosférica.

Já os valores de $p > 0,05$ indicam que as amostras *não diferem significativamente* entre si quanto aos níveis de mutagênese. Neste caso, um valor obtido de $p = 0,30$, por exemplo, significa que a chance da diferença entre as médias ser devido ao acaso (e não um efeito da poluição) é de 30%. Ou seja, se for afirmado que as diferenças entre as médias ocorreram por causa da poluição, tem-se 30% de chances de estar enganado na conclusão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após a aplicação do Ensaio Cometa com as linhagens *Oregon-R* de *Drosophila melanogaster* em três diferentes locais de Pernambuco estão descritos na **Tabela 1**, onde são apresentados os valores absolutos e médios de dano genético (níveis de 0 a 4), o Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%). Os valores foram calculados para cada uma das três réplicas de cada local, e para os seus valores médios.

Para fins comparativos, na **Tabela 1** foram incluídos os resultados parciais do Ensaio Cometa de Verçosa (2015) referente ao controle negativo com *D. melanogaster Oregon-R*. No caso deste controle negativo, o experimento foi realizado pelo autor nas dependências do Laboratório de Genética do CAV-UFPE.

Tabela 1. Avaliação de *dano genético* (classificado de 0 a 4), *índice e frequência de danogenético* em três réplicas (e sua média) dos experimentos com larvas de *Drosophila melanogaster* (linhagem *Oregon-R*), expostas à poluição atmosférica de uma área urbana, e larvas expostas a uma área rural do município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Também são apresentados os resultados do grupo exposto ao Parque Nacional do Catimbau, em Buíque (uma área sem poluição urbana), além dos resultados *controle negativo* (três réplicas e média) realizado por Verçosa (2015), nas condições do Laboratório de Genética do CAV-UFPE.

Linhagem Tratamento	Nível de Dano Genético					Índice e Frequência de Dano Genético	
	0	1	2	3	4	ID	FD%
Área Urbana	60	13	08	10	09	95	40
Área Urbana	83	07	02	06	02	37	17
Área Urbana	61	17	09	11	02	76	39
Média	68,00	12,33	6,33	9,00	4,33	69,31	32,00
Área Rural	88	08	02	02	0	18	12
Área Rural	87	12	01	0	0	14	13
Área Rural	93	05	02	0	0	09	07
Média	89,33	8,33	1,70	0,7	0	13,68	10,67
Catimbau	82	09	06	03	0	30	18
Catimbau	78	07	13	02	0	39	22
Catimbau	88	07	03	02	0	19	12
Média	82,67	7,67	7,33	2,33	0	29,33	17,33
*Controle -	77	15	8	0	0	102	43
*Controle -	78	17	5	0	0	105	46
*Controle -	80	15	5	0	0	92	44
*Média	78,33	15,67	6,00	0	0	27,67	21,67

*Controle negativo, obtido por Verçosa (2015). ID representa o Índice de Dano, e FD%, a Frequência de Dano.

Uma análise das médias da **Tabela 1** evidencia valores altos de dano zero (sem qualquer alteração no DNA) do Ensaio Cometa tanto na área rural (89,33) quanto no Catimbau (82,67). Por outro lado, a **Tabela 1** revela valores altos de dano 3 e 4 (danos médio-alto e máximo, respectivamente, observados no DNA) na área urbana (valores 9,00 e 4,33, respectivamente) e no experimento do controle negativo laboratorial de Verçosa (2015) é notável a ausência dos danos de maiores intensidades (dano 3 e dano 4), com resultados dos valores médios de Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD) mais aproximados da exposição realizada em uma zona rural e no Catimbau (Controle negativo ambiental). Por outro lado, os valores dos referidos parâmetros foram bem superiores quando comparados ao grupo exposto a uma zona urbana. A **Figura 7** mostra um gráfico das variações das frequências dos danos (0 a 4) e suas médias, por local.

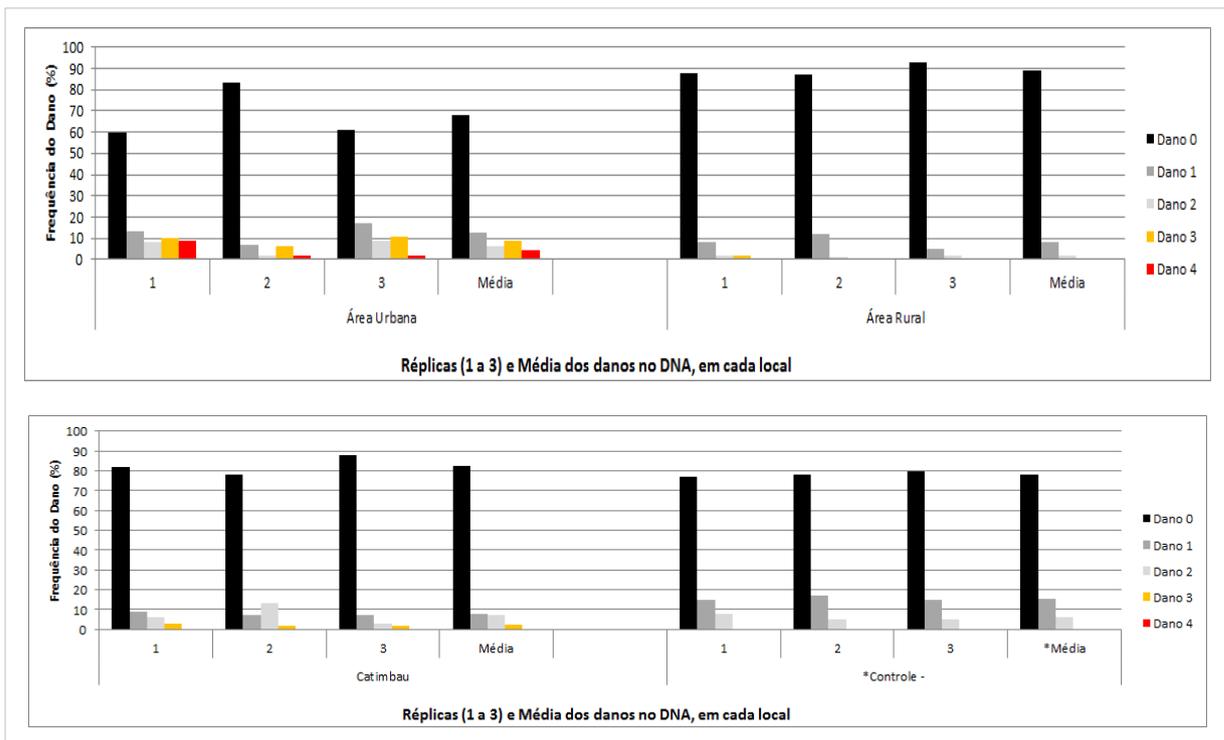


Figura 7. Gráficos da ocorrência de danos genéticos (0 a 4) entre as três réplicas de cada experimento, e das suas médias, conforme **Tabela 1**, para cada local investigado (área urbana, rural e Parque Nacional do Catimbau) e para o grupo controle negativo, de Verçosa (2015), cidade de Vitória de Santo Antão. A cor amarela e vermelha representam os danos mais intensos no DNA e que ocorreram em maior frequências na área urbana de Vitória de Santo Antão (Avenida Mariana Amália).

Os dados da análise estatística das comparações entre as réplicas dos locais estudados para o Ensaio Cometa estão mostrados na **Tabela 2**. Foram feitas comparações pareadas (duas a duas) entre os todos locais estudados e também com em comparação com os dados do controle negativo estabelecidos por Verçosa (2015), um experimento também realizado no município de Vitória de Santo Antão.

Os resultados observados no Ensaio Cometa com hemócitos de larvas *Drosophila melanogaster* demonstraram significativo aumento de danos genéticos nos organismos submetidos ao ambiente urbano de Vitória de Santo Antão, em comparação aos organismos expostos ao ambiente rural, ao Parque Nacional do Catimbau e ao controle negativo estabelecido por Verçosa (2015) no laboratório.

Tabela 2. Análise comparativa e níveis de significância (p) obtidos nas comparações dos resultados do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* expostos ao Catimbau, e área urbana e rural de Vitória de Santo Antão. Dados do controle negativo foram obtidos de Verçosa (2015).

Local (réplica)	Significância (p)
Área urbana (1) x área rural (1)	0,0001*
Área urbana (2) x área rural (2)	0,3120
Área Urbana (3) x área rural (3)	0,0001*
Soma das réplicas	0,0001*
Área urbana (1) x catimbau (1)	0,0001*
Área urbana (2) x catimbau(2)	0,4460
Área Urbana (3) x catimbau(3)	0,0001*
Soma das réplicas	0,0001*
Área urbana (1) x controle - (1)	0,0010*
Área urbana (2) x controle - (2)	0,5650
Área urbana (3) x controle - (3)	0,0010*
Soma das réplicas	0,0001*
Área rural (1) x catimbau (1)	0,2150
Área rural (2) x catimbau (2)	0,0470*
Área rural (3) x catimbau(3)	0,2160
Soma das réplicas	0,0100*
Área rural (1) x controle - (1)	0,0440*
Área rural (2) x controle - (2)	0,0810
Área rural (3) x controle - (3)	0,0080*
Soma das réplicas	0,0001*
Catimbau (1) x controle - (1)	0,6980
Catimbau (2) x controle -(2)	0,4730
Catimbau (3) x controle -(3)	0,1500
Soma das réplicas	0,3350

*Valores significativos

Os dados mostram também que a metodologia do Ensaio Cometa aplicada foi sensível à detecção de danos genéticos provocados pelos efeitos da poluição e que diferenças foram observadas entre ambientes rurais preservados e ambientes urbanos poluídos. As medidas de cada dano genético, o índice de dano e na frequência de dano, mostraram resultados indicativos do efeito da poluição da cidade sobre os demais locais. Entre as réplicas de cada local estudado houve diferenças nos resultados, variando do significativo para o não significativo, o que

reforça ainda mais a recomendação de se trabalhar com réplicas, ou seja, com caixas de populações individualizadas expostas nos locais.

A melhor escolha seria expor as larvas de *D. melanogaster* controle negativas em locais o mais livres de poluição possível, como os preservados e longe de outros centros urbano. Neste sentido o Parque Nacional do Catimbau se mostrou um excelente local para este fim.

Este estudo permitiu, mais uma vez, confirmar que *Drosophila melanogaster* é um excelente organismo para estudo da genotoxicidade através do Ensaio Cometa (revisão em Gaivão & Sierra, 2014), neste caso, para uso de hemócitos de larvas submetidas a condições de poluição atmosférica.

Nossos resultados também estão de acordo com os apresentados por Verçosa (2015) quando ele comparou o efeito da poluição atmosférica associada à urbanização, investigando a cidade do Recife, capital de Pernambuco, e um ambiente rural, distante 19 km em sentido oeste. No experimento foi também utilizada a espécie *D. melanogaster* e o Ensaio Cometa, porém as células estudadas foram hemócitos de adultos, e não larvas. O autor demonstrou que houve diferenças significativas entre o experimento realizado em Recife, após seis dias de exposição dos adultos no ambiente, em relação ao controle negativo, estabelecido em laboratório (controle de adultos e não larvas, do Laboratório de Genética do CAV-UFPE). Entretanto, Verçosa (2015) não observou diferenças entre os indivíduos expostos em Recife e os adultos expostos ao um ambiente considerado rural (distrito de Aldeia, município de Paudalho), sugerindo que fontes poluentes, como a presença de uma Usina Termoeletrica a 6 km do local estudado, possam estar contribuindo para um efeito significativamente poluente no ambiente rural, igualando-o ao ambiente da capital Recife, mesmo que na região exista uma grande área verde de preservação.

Em nosso estudo observou-se que o ambiente considerado rural em Vitória de Santo Antão, de fato se mostrou menos poluído, visto os resultados já discutidos aqui, que foram: menores danos genéticos em relação à área urbana, e sem diferenças significativas em relação ao Parque Nacional do Catimbau (em duas réplicas). Este resultado de baixo nível de dano no ambiente rural poderá, no futuro, ser melhor investigado por outras equipes de pesquisa e novos experimentos. Um fato importante e relevante, entretanto, e que deve ter continuidade nos próximos

estudos, é que o ambiente urbano de Vitória de Santo Antão parece estar causando prejuízos genéticos, ao nível do DNA, aos organismos e seres humanos residentes na área urbana. Medidas de preservação e controle da poluição precisam ser tomadas, caso novas evidências corroborem os resultados aqui apresentados.

Assim, este trabalho abre perspectivas para que novas amostragens sejam realizadas na cidade, inclusive àquelas relacionadas à investigação da genotoxicidade nas proximidades de lixões e grandes indústrias, antigas ou recentemente implantadas no município, fruto do recente crescimento econômico e de sua expansão.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível verificar que os agentes atmosféricos associados à urbanização são capazes de provocar danos no material genético, ou seja, efeitos genotóxicos nos indivíduos expostos. A cidade de Vitória de Santo Antão teve um significativo aumento do investimento industrial, imobiliário e crescimento populacional, o que pode estar acarretando a liberação de monóxido de carbono, organovoláteis, organometálicos e outros contaminantes na atmosfera. Estes poluentes podem resultar em genotoxicidade, conforme demonstram nossos dados com o organismo modelo *Drosophila melanogaster*.

Na comparação entre os resultados das áreas urbana e rural de Vitória de Santo Antão, e de ambas com o Parque Nacional do Catimbau, houve diferenças significativas em relação ao índice e frequência de danos genéticos. Os resultados comprovam e demonstram que os indivíduos estudados expostos em área de grande urbanização sofreram maior impacto dos poluentes atmosféricos, uma vez que o ponto estudado está situado em uma avenida com intenso tráfego de veículos, que são as maiores causas da poluição atmosférica, responsáveis por danos celulares e à saúde. Os resultados abrem perspectivas para que mais estudos sejam realizados sobre a poluição ambiental em ambientes urbanos, bem como outros agentes, através da metodologia do Ensaio Cometa utilizando a *D. melanogaster* como modelo experimental.

7. REFERÊNCIAS

ARIAS, A.R.L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência&Saúde**, v. 12, n. 1, p. 61-72. 2007.

BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Biomarkers for monitoring adverse health effects of air pollution in humans. **Journal of Translational Toxicology**.v.1, p. 46-51, 2014.

BARSIENĖ, J.; *et al.* Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels before and after an oil spill at the marine oil terminal in the Baltic Sea. **Environmental Monitoring and Assessment**.v.184, p. 2067-2078, 2012

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**. v.415, p. 167-184,1998.

BROWN, T. A. Alteração do Material Genético. In: **Genética: um enfoque molecular**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p. 135-151, 1999.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Coffeeand mate tea as a dietarysourceof polycyclicaromatic hydrocarbon (PAHs) in Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 22, n.1, p. 49-53, 2012.

CIVETTA M.T.M.; CIVETTA J.D. Carcinogénesis. **Salud Publica de Mexico**. v. 53, p. 405-415. 2011.

COLLINS A.; *et al.* The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research** v. 759, p. 27-39. 2014.

FRANKHAM, R. Stress and adaptation in conservation genetics. **Journal of Evolutionary Biology** v. 18, p. 750-755, 2005.

GAIVÃO, I.; SIERRA, M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v.5, Article 304, 2014.

GODSCHALK, R.W.; *et al.* DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutation Research** v. 757, p. 60-67, 2013.

GREENSPAN, R. J. **Fly Pushing - The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2004.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Polynuclear Aromatic Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Part 1, Chemical, **Environmental and Experimental Data**, v. 32, December, 1983, Lyon, France.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Censo Demográfico**, 2014.

LENZ, S; *et al.* *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, p. 453-460, 2013.

LEMOS, A.T.; *et al.* Mutagenicity of particulate matter fractions in areas under the impact of urban and industrial activities. **Chemosphere**, v. 89, p. 1126-1134, 2012

MUSSALI-GALANTI, P.; *et al.* Genetic Structure and Diversity of Animal Populations Exposed to Metal Pollution. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 227, p.79-106, 2014.

NEHLIG, A.; DEBRYB, G. Potential genotoxic, mutagenic and anti-mutagenic effects of coffee: A review. **Mutation Research**, v. 317, p. 145-162, 1994.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: A review. **Mutation Research**, v.567, p. 109–149, 2004.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v.1, n.1, p.23-29, 2006.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, p. 291-298, 1984.

REDLARSKI, G.; *et al.* The influence of electromagnetic pollution on living organisms: historical trends and forecasting changes. **BioMed Research International**, v. 2015, n. ID 234098, p. 1-18, 2015.

ROUSE, J.; JACKSON, S.P. Interfaces between the detection, signaling and repair of DNA damage. **Science**, v. 547, p. 546-551, 2013.

SANCAR, A.; *et al.* Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Review Biochemistry**, v.73, p. 39-85, 2004.

SILVA, E.J. **Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar**. Dissertação (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SILVA, J.; *et al.* An alkylene single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 241-245, 2000.

SINGH, N.P.; *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** v. 175, p. 184-191, 1988.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. Mutação, Reparo do DNA e Recombinação. In: **Fundamentos de Genética**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p. 312-314, 2001.

VERÇOSA, C.J. **Aplicação do Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação da genotoxicidade ambiental**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade de Pernambuco, Recife, 80 f., 2015.