



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INVESTIGAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE LARVICIDAS
BIOLÓGICOS E SÍNTETICOS UTILIZADOS PARA O CONTROLE DE
*Aedes Aegypti***

Maria Eliane Bezerra de Mélo

Recife - PE / 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INVESTIGAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE LARVICIDAS
BIOLÓGICOS E SÍNTETICOS UTILIZADOS PARA O CONTROLE DE
*AEDES AEGYPTI***

Tese apresentada como um dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Pernambuco

Orientadoras:

Prof^a. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho.
Depto. de Biofísica e Radiobiologia - C. C. B - U. F. P E.

Prof^a. Dra. Lêda Narcisa Regis.
Depto. de Entomologia - CPqAM – FIOCRUZ

Recife - PE / 2009

Mélo, Maria Eliane Bezerra de
Investigação da genotoxicidade de larvicidas biológicos
e sintéticos utilizados para controle de *Aedes aegypti* /
Maria Eliane Bezerra de Mélo. – Recife : O Autor, 2009.
128 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Genotoxicidade - Organofosforado - Temefós. 2.
Bacillus thurigiensis sorovar. *Israelensis* (Bti). 3. Dengue.
I. Título.

615.285
614.9

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-094



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Rocife, 30 de abril de 2009.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 30 de abril de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho (Deptº de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Ivone Antônia de Souza (Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Ivone Antônia de Souza

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Silene Carneiro do Nascimento (Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: Silene Carneiro do Nascimento

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Simey de Souza Leão Pereira Magnata (Universidade Salgado de Oliveira - UNIVERSO)

Assinatura: Simey de Souza Leão Pereira Magnata

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho (Deptº de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: Nicodemos Teles de Pontes Filho

***“O saber não basta, temos de aplicá-lo,
a vontade não basta, temos de atuar.”***

(Goethe)

“É graça divina começar bem,

Graça maior é persistir na caminhada certa,

Mas, a graça das graças, é não desistir nunca”.

(Dom Hélder Câmara)

DEDICATÓRIA

Este trabalho é inteiramente dedicado
a minha mãe, Amália Clemente, pelo exemplo de vida...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por inspirar meus pensamentos, guiar meus passos e apaziguar meus sentimentos.

Ao Dr. Aggeu Magalhães Filho, por ter despertado em mim o interesse pela investigação científica.

A minha mãe, aos meus irmãos e sobrinhos, pela representatividade na minha existência.

Aos meus familiares, pela confiança em mim depositada em todos os momentos de minha vida.

As minhas orientadoras e amigas Dras. Teresa Jansem e Lêda Regis, que, desde o momento do aceite na orientação, vem transmitindo conhecimentos, apoiando-me, encorajando-me, e depositando confiança plena na realização deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Rolim e demais professores do programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE pelos ensinamentos e apoio.

A Conceição Barros e Margarete Valdevino, secretárias da pós-graduação, pela dedicação e desenvoltura.

Aos colegas que compõem a equipe do biotério, pela indispensável ajuda técnica.

Aos estagiários Keyla Oliveira, Kleison Merlo, Raul Fernandes e Renato Tôrres, pela contribuição imprescindível para a realização deste trabalho.

A Daniela Anastácio, do Departamento de Entomologia, pela valiosa participação para a realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório André Rocha e Paulo Izidio, pela imensurável colaboração.

Aos bibliotecários Adagilson Batista, Megine Guimarães e Márcia Saturnino, pelos serviços de acervo e normatização bibliográfica.

A George Diniz, pela dedicação e contribuição nas análises estatística.

A Gilvan Mariano, pela presteza e colaboração como designer gráfico.

A Cristiane Brito, secretária do Departamento de Parasitologia, pela dedicação e excelente desempenho.

Aos colegas que compõem a equipe do setor de informática, pela colaboração.

Aos colegas e amigos do Departamento de Parasitologia, pelo incentivo constante.

Aos professores examinadores, pela contribuição científica no engrandecimento deste trabalho.

A todos os amigos que me apoiaram com a emissão de pensamentos positivos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

xii

ABSTRACT

xiii

CAPÍTULO I

1. – INTRODUÇÃO

18

CAPÍTULO II

2. – OBJETIVOS

22

2.1. - Geral

22

2.2. – Específicos

22

CAPÍTULO III

3. - REVISÃO DA LITERATURA

24

3.1. - Dengue – Histórico.

24

3.2. - Dengue - Aspectos Epidemiológicos

25

3.3. - Dengue – Transmissão

27

3.4. - Controles de Vetores Hematófagos

28

3.5. - Uso de larvicidas à base de bactérias entomopatógenas no controle de vetores

30

3.6. - Uso de Praguicidas no controle de vetores

33

3.6.1. – Genotoxicidade dos praguicidas sintéticos

35

3.7. - Inseticidas Biológicos: *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti)

37

3.8. – Mutação

39

3.8.1. – Monitoramento biológico na aferição da genotoxicidade

40

3.8.2. – Determinação da genotoxicidade: testes citogenéticos

42

CAPÍTULO IV

4. - ARTIGO PUBLICADO 46

Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos

CAPÍTULO V

5. - ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO 53

Mutação e danos cromossômicos: revisão*

CAPÍTULO VI

6. - MATERIAL E MÉTODO 80

6.1. - Inseticida sintético organofosforado Temefós (grau técnico 95,5%) 80

6.2. – Larvicida microbiano: *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (*Bti*) 80

6.3. - Fármaco com ação antineoplásica e citostática: Ciclofosfamida 80

6.4. – Outros materiais utilizados 80

6.5. – Metodologia 80

6.5.1. - Animais experimentais 80

6.6. - Teste de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos 81

6.6.1. - Inseticida sintético Temefós - protocolo metodológico 81

6.6.2. - Larvicida microbiano: *Bti* - protocolo metodológico 83

6.6.3. - Teste de Micronúcleo - descrição metodológica 84

6.6.4. - Teste de metáfase em células de medula óssea de camundongos 85

6.6.5. - Inseticida sintético Temefós - protocolo metodológico 85

6.6.6. - Teste de metáfase - descrição metodológica 86

6.6.7. - Avaliação de citotoxicidade, no teste de metáfase, através do índice mitótico (I M%) 88

6.7. - Análises estatística 88

CAPÍTULO VII

7. - RESULTADOS E DISCUSSÃO 90

7.1. - Testes de micronúcleo em grupos expostos ao inseticida Temefós 90

7.2. - Testes de metáfase em grupos expostos ao inseticida Temefós 90

7.3. - Testes de metáfase – tabelas	92
7.4. - Representação fotográfica de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN)	101
7.5. - Representação fotográfica de metáfases com aberrações cromossômicas	102
7.6. - Testes de micronúcleo em grupos expostos ao larvicida microbiano <i>Bti</i>	103

CAPÍTULO VIII

8. – CONCLUSÕES	107
-----------------	-----

CAPÍTULO IX

9. – PERSPECTIVAS	109
-------------------	-----

CAPÍTULO X

10. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
----------------------------------	-----

CAPÍTULO XI

ANEXOS	123
--------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

(AC) – Aberração Cromossômica
(*Bti*) - *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*
(CPA) - Ciclofosfamida
(DDT) – Dicloro–Difenil-Tricloroetano
(DL₅₀) – Dose Letal para 50% da amostra
(DMT) – Dose Máxima Tolerada
(IM) – Índice Mitótico
(NCE) - Eritrócito Normocromático
(OMS) - Organização Mundial da Saúde
(OPAS) - Organização Pan-Americana de Saúde
(PCE) – Eritrócito Policromático
(PCEMN) – Eritrócito Policromático Micronucleado
(PEAa) – Plano para Erradicação do *Aedes aegypti*
(UFC) – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do modo de ação do <i>Bti</i>	38
Figura 2 – Representação fotográfica de eritrócitos policromáticos micronucleados	101
Figura 3 – Representação fotográfica de metáfases com aberrações cromossômicas	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> (<i>Bti</i>)	31
Tabela 2 – Resultado das análises cromossômicas em células de medula óssea de camundongos machos, 24 horas após tratamento com temefós, CPA e água destilada	92
Tabela 3 – Resultado das análises cromossômicas em células de medula óssea de camundongos fêmeas, 24 horas após tratamento com temefós, CPA e água destilada	93
Tabela 4 – Determinação dos índices mitóticos em células de medula óssea de camundongos machos e fêmeas, 24 horas após tratamento com temefós, CPA e água destilada	94
Tabela 5 – Resultado das análises cromossômicas em células de medula óssea de camundongos machos, 48 horas após tratamento com temefós, CPA e água destilada	95
Tabela 6 – Resultado das análises cromossômicas em células de medula óssea de camundongos fêmeas, 48 horas após tratamento com temefós, CPA e água destilada	96
Tabela 7 – Resultado das análises cromossômicas em células de medula óssea de camundongos machos, 72 horas após tratamento com temefós, CPA e água destilada	97
Tabela 8 – Resultado das análises cromossômicas em células de medula óssea de camundongos fêmeas, 72 horas após tratamento com temefós, CPA e água destilada.	98
Tabela 9 – Determinação dos índices mitóticos em células de medula óssea de camundongos machos e fêmeas, 24, 48 e 72 horas após tratamento com temefós, CPA e água destilada	99
TABELA 10 - Análise citotóxica dos resultados obtidos após 24 e 48 horas do tratamento com <i>Bti</i> (204 e 122,4 Unidades Formadoras de Colônia - UFC) em camundongos machos e fêmeas.	103
Tabela 11 - Análise citotóxica dos resultados obtidos após 24 e 48 horas do tratamento com água (200 µl) e <i>Bti</i> (204 e 122,4 UFC) em camundongos machos e fêmeas.	104

RESUMO

A dengue é atualmente considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem. O agravamento desta situação epidemiológica tem acarretado um aumento expressivo no uso de inseticidas organofosforados no combate ao vetor, principalmente o temefós, que é amplamente e sistematicamente aplicado em ambientes urbanos em reservatórios de água, até para o consumo humano. Este projeto propôs investigar efeito genotóxico (clastogênico) em células de mamíferos, induzido pela exposição ao temefós (grau técnico 95,5%), e ao biolarvicida *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelenses* (*Bti*) - IPS 82, ambos empregados no controle do *Aedes aegypti*. Na avaliação genotóxica foram utilizadas células da medula óssea de camundongos albinos *Swiss Webster* de ambos os sexos, empregando-se os testes de metáfase e de micronúcleos para detecção dos danos cromossômicos: aberrações cromossômicas e micronúcleos. Os camundongos foram tratados com temefós (grau técnico 95,5%) nas concentrações de 27,75; 55,5 e 111 mg/kg ou com água destilada 10 ml/kg, via gavagem, como controle negativo ou com Ciclofosfamida a 25 mg/kg, via i.p., como controle positivo por 24, 48 e 72h, em dose única ou em 9 doses repetidas (1 dose/semana). Outros grupos foram tratados com *Bti* nas doses de 204 e 122,4 UFC (Unidade Formadora de Colônia) ou água destilada (200 µl) como controle negativo, via gavagem, por 24 e 48h. Os resultados observados confirmaram a ação genotóxica induzida pelo inseticida temefós em camundongos de ambos os sexos, com a formação de micronúcleo em eritrócitos policromáticos (PCE MN), em todas as concentrações testadas 24h após o tratamento único. Na concentração de 111,00 mg/kg induziu PCE MN também após 48 e 72h em dose única e após tratamento com 9 doses. O temefós induziu também aberrações cromossômicas nas células em metáfases, em todas as concentrações testadas, 24h após tratamento único, e na concentração de 111,00 mg/kg, também após 48 e 72h de tratamento único. A Ciclofosfamida padronizada como controle positivo, para detecção de genotoxicidade, assegurou a confiabilidade dos experimentos realizados nos padrões estabelecidos. O *Bti*, através dos experimentos realizados, não induziu formação de micronúcleos, portanto, não foi considerado como um agente mutagênico e/ou genotóxico. A citotoxicidade do *Bti* também foi avaliada em diferentes doses e tempos de permanência em ambos o sexo, não apresentando diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em comparação com o controle negativo. Esta investigação veio comprovar a preocupação pelos potenciais riscos que o uso sistemático, constante ou mesmo esporádico de inseticidas de síntese em ambiente antropico, na agricultura e em programas de controles de vetores, pode induzir ao homem ao nível mutagênico e/ou genotóxico. É imprescindível, para o

uso seguro para a saúde e o meio ambiente, a investigação do potencial mutagênico e/ou genotóxico de produtos utilizados para o controle de insetos.

Palavras – chave: organofosforado, temefós, *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelenses* (Bti), teste de micronúcleo, teste de metáfase, aberração cromossômica, micronúcleo, genotóxico.

ABSTRACT

Lately, the dengue fever has been considered the most important arbovirus affecting human kind. The aggravation of this epidemiologic situation has caused an expressive increase in the use of organofosforate insecticides in the combat of the vector, mainly temephos, which is widely and systematically applied in urban environments' water reservoirs, even for the human consumption. This project aimed to investigate the genotoxic effect (clastogenic) on mammals' cells, induced due to exposition to temephos (technical degree 95.5%), and to the microbial larvicide *Bacillus thuringiensis* subspecies. *israelensis* (*Bti*) - IPS 82, both employed in the control of the *Aedes aegypti*. The bone marrow of albinic Swiss Webster mice of both sexes was used for the genotoxic evaluation, employing metaphase and micronuclei tests for detection of chromosomic damages: chromosomic aberrations and micronuclei. The mice were treated with temephos (technical degree 95,5%) in the concentrations of 27,75; 55,5 and 111mg/kg or with distilled water (10ml/kg) through gavage as negative control; or with cyclofosfamide (25mg/kg) through per via i.p., injection as positive control for 24, 48 and 72 hours, in single-dose or in repeated doses, one per week (9 doses). Other groups were treated with *Bti* doses of 204 and 122,4 cfu/g (colony-forming units per gram) or distilled water (200µL) with negative control, through gavage, for 24 and 48h. The results observed confirmed the genotoxic action induced by the temephos insecticide in mice of both sex, with formation of micronuclei in polychromatic erythrocyte (PCE MN), in all concentrations tested 24 hours after the single treatment. In the 111,00mg/kg concentration, PCE MN was also induced after 48 and 72 hours in the single-dose treatment and after the 9 doses treatment. The temephos also induced chromosomic aberrations in metaphase cells, in all tested concentrations, after 24 hours of single-dose treatment and also with the concentration of 111,00mg/kg after 48 and 72 hours of single-dose treatment. The cyclophosphamide, standardized as positive control for the detection of genotoxicity, assured the trustworthiness of the experiments carried in the established standards. The *Bti*, through the carried experiments, did not induced the formation of micronuclei. Therefore, it was not considered as a mutagenic agent and/or a genotoxic agent. The cytotoxicity of the *Bti* was also evaluated in different doses, sex and times of permanency, not presenting statistically significant differences in the 5% level in comparison with the negative control. This investigation, thus, proves the concern for the potential risks that the systematic, constant or even sporadic use of insecticides of synthesis in the antropic scope, in agriculture and in programs for the control of vectors, can induce in men at the mutagenic

and/or genotoxic level. Therefore, the evaluation of the mutagenic and/or genotoxic potential of products utilized in the control of insects is essential, for the safe use, health and environment.

Key words: organofosforate, temephos, *Bacillus thuringiensis* subspecies. *israelenses* (Bti), micronucleous test, metaphase test, chromosomic aberrations, micronuclei, genotoxic.

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do papel de insetos hematófagos como vetores biológicos de patógenos ao homem, programas de controle de populações dos vetores têm sido estabelecidos. A partir do surgimento dos inseticidas de síntese (décadas de 1940), enormes volumes de recursos têm sido dirigidos ao uso de milhares de toneladas destas moléculas tóxicas em todo o mundo (Secretaria Estadual de Saúde, 1997; CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 2001). Com a implantação do Programa para a Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), pelo Ministério da Saúde no Brasil em 1996, o Temefós, vem sendo aplicado como larvicida nos criadouros do *Aedes aegypti*, bem como outros organofosforados e piretróides para o controle de insetos alados, como a principal ação no combate a esta doença. Em média, 4.937 toneladas de formulação a base de temefós tem sido utilizadas por ano, inclusive em recipientes com água potável para uso humano.

O agravamento da situação epidemiológica da Dengue em todo o mundo tem levado a um expressivo aumento no uso de organofosforados, em especial o Temephos®, em ambientes urbanos (ZAIM; GUILLET, 2002).

O uso destes produtos tem sido seguido, segundo a FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (2000), por uma posição mais prudente, em face de problemas resultantes principalmente do surgimento de resistência e da ausência de seletividade com conseqüente impacto indesejável sobre o homem, outras populações animais e o meio ambiente.

Sabe-se que os inseticidas sintéticos não são seletivos, agredem o meio ambiente e apresentam efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre invertebrados e vertebrados. A literatura científica disponibiliza dados resultantes de estudos experimentais em mamíferos, bem como, de estudos epidemiológicos que comprovam que os efeitos crônicos resultantes da exposição prolongada a diferentes moléculas de inseticidas organoclorados e organofosforados, com comprometimentos miotóxicos, neurotóxicos, genotóxicos, imunotóxicos e mutagênicos sobre mamíferos, tem se acumulado (DULOUT *et al* 1985; DEGRAEVE *et al* 1984; DEGRAEVE; MOUTSCHEN, 1984; DEFERRARI *et al* 1991; GARRETT, 1992; EYER, 1995; CAVALIERE *et al.*, 1996; MELO *et al.*, 2008).

Em face dos danos causados pelo uso dos inseticidas de síntese, assim como, o surgimento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos utilizados em programas para o seu

controle, surgiu a necessidade de se empregar diferentes métodos para o controle de insetos transmissores de doenças, em especial o controle biológico.

A descoberta da ação larvívora de algumas bactérias do gênero *Bacillus*, como o *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (*Bti*) e *Bacillus sphaericus* (*Bs*) (GOLDBERG; MARGALIT, 1977; KAR *et al.*, 1997), que agem sobre espécies de culicídeos e simulídeos, abriu novas perspectivas para o controle de mosquitos e borrachudos. Estas bactérias passaram a ser empregada nos programas de controle do *Aedes aegypti* apresentando uma vantagem principal sobre os inseticidas de síntese: sua ação seletiva sobre dípteros e que resulta do seu modo específico de ação sendo, portanto, ambientalmente seguro (REGIS *et al.*, 2000). *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (*Bti*) é uma bactéria aeróbica esporulante, Gram positiva, pertencente à família Bacillaceae. Foi isolada pela primeira vez em Israel, em cadáveres de larvas de *Culex pipiens*, por Goldberg e Margalit (1977), e posteriormente foi caracterizada pelo método de análise sorológica do antígeno-H como sorovariedade H-14 (DE BARJAC, 1978).

O uso do biolarvívoro *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (*Bti*) no combate ao vetor, em larga escala, foi iniciada em 1982, para garantir a sustentabilidade de programas, ameaçada pelo aparecimento de resistência ao temefós nas populações alvo. Este fato ocorreu quase simultaneamente no OCP (Onchocerciasis Control Programme) para o controle de *Simulium* spp na África (GUILLET, 1990; BISSAN *et al.*, 1995) e no KABS (German Mosquito Control Association) para controle de *Aedes* sp no Vale do Reno, Alemanha (BECKER, 2000) e, alguns anos mais tarde (1986), no Programa de Controle de Borrachudos no RS (MARDINI *et al.*, 1999). No Brasil, além do programa pioneiro no Rio Grande do Sul, abrangendo 170 municípios na Serra Gaúcha, o Programa de Controle do *Simulium pertinax*, no litoral norte de São Paulo, passou a utilizar exclusivamente *Bti* a partir de 1990 (ARAÚJO - COUTINHO, 1995).

O presente estudo foi realizado através dos testes *in vivo*, de micronúcleos e de metáfase, em células de medula óssea de camundongos de ambos os sexos, possibilitando detectar possíveis danos cromossômicos estruturais, capazes de identificar a clastogenicidade induzida pelos larvívicos temefós e *Bti*, frente a tratamentos únicos e repetitivos.

Mediante as evidências, a relevância dessa abordagem científica consistiu em produzir conhecimentos sobre os efeitos mutagênicos e genotóxicos em células de mamíferos, induzidos pela exposição ao inseticida organofosforado temefós (grau técnico) bem como avaliar o

potencial genotóxico do biolarvicida *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelenses* (*Bti*), usados no combate ao vetor da dengue.

Espera-se que tais conhecimentos contribuam aos serviços de Saúde, no sentido de re-avaliar as práticas dos programas oficiais de controle de vetores, assim como, os potenciais riscos destes produtos para a saúde humana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar potenciais efeitos genotóxicos (clastogênicos) em células de mamíferos, induzidos pela exposição ao inseticida organofosforado Temefós (grau técnico 95,5%), e ao biolarvicida *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelenses* (*Bti*), amplamente empregados no controle de *Aedes aegypti*, visando contribuir para a avaliação dos riscos da exposição humana prolongada a esses agentes de controle.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Detectar possíveis danos cromossômicos estruturais causados pelos larvicidas temefós e *Bti* através de testes *in vivo*, de micronúcleos e de metáfase, em células de medula óssea de camundongos, capazes de identificar a clastogenicidade induzida frente a tratamentos únicos e repetitivos.
- b) Mensurar o nível de efeitos citotóxicos dos larvicidas em células de mamíferos, quanto à dinâmica do ciclo celular, através do cálculo do índice mitótico, frente a tratamentos único e repetitivo.
- c) Analisar, à luz dos resultados, os riscos potenciais, em termos de genotoxicidade, da exposição continuada das populações humanas ao organofosforado Temefós e às protoxinas do *Bti*.

CAPÍTULO III
REVISÃO LITERÁRIA

3. REVISÃO LITERÁRIA

3.1. - Dengue - Histórico

Os primeiros registros sobre Dengue datam do final do Século XVIII, quando do surgimento de surtos da doença na Ilha de Java em 1779, e em 1780 na Filadélfia (E. U.A.). Há, entretanto, discordância de datas quanto à primeira epidemia. Há relatos de que tenha ocorrido em 1784 na Europa, enquanto outros autores citam que ocorreu em Cuba, em 1782. Naquela época, a doença era conhecida como “febre quebra ossos”, devido às fortes dores causadas nas articulações (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). Estes dados revelam que a ocorrência de Dengue foi documentada nas Américas há mais de 200 anos.

No Século XIX, com a intensificação do transporte comercial entre os portos da região do Caribe e do Sul dos Estados Unidos, surgiram as grandes epidemias nas Américas. A primeira, em 1827 no Caribe e Costa Atlântica dos Estados Unidos, a partir do Porto de Virgínia. A segunda, no período de 1848 a 1850 atingindo Havana, Nova Orleans e várias outras cidades. A terceira epidemia ocorreu após 29 anos, entre 1879 e 1880, abrangendo novamente a região do Caribe (Cuba, Panamá, Porto Rico, Ilhas Virgens e Venezuela), (BARBOSA, 1996).

Especificamente no Brasil, há referências de que a doença foi documentada em 1846-1848, quando uma epidemia atingiu o Rio de Janeiro, São Paulo, Salvador e outros estados, recebendo na época as denominações de “polca”, “patuleia” e “febre eruptiva reumatiforme”. Uma outra epidemia surgiu em São Paulo, entre 1851 e 1853, tendo ficado conhecida pelo nome de “urucubaca” (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001).

Até o Século XX, a Dengue foi considerada como uma epidemia que surgia a intervalos de 10 a 40 anos. Nas primeiras décadas do século, várias epidemias de Dengue foram registradas, em diferentes continentes: de 1904 a 1905 na Austrália; de 1905 a 1912 no Panamá; em 1916, uma epidemia da “urucubaca” assola o Estado de São Paulo; em 1921 na África do Sul; em 1925 na África Oriental e de 1927 a 1928 na Grécia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001).

Depois da Segunda Guerra Mundial, com o advento do transporte aéreo, as epidemias recrudescentes e a doença transformou-se em pandemia, tendo se iniciado no Sudeste Asiático e intensificando-se nos últimos 20 anos. Circulação dos quatro sorotipos do vírus da Dengue

submeteu o Continente da Ásia a epidemias de Dengue Clássico (DC) e de Dengue Hemorrágico (DH), favorecendo a ocorrência endêmico-epidêmica da doença, tornando-se um sério problema de Saúde Pública ao nível mundial. Os primeiros casos de Dengue na forma hemorrágica surgiram na Ásia, na década de 50. Na ocasião, a DH foi considerada uma das principais causas de óbito no Vietnã. Foram registradas várias epidemias de DH no Sudeste Asiático, abrangendo sequencialmente, entre 1956 e 1970, as Filipinas, a Tailândia, o Vietnã do Sul, Singapura, Índia, Malásia, Indonésia e Birmânia (BARBOSA, 1996).

Nas Américas, em 1981, a DC/DH surgiu como uma epidemia de grandes proporções em Cuba, alastrando-se posteriormente para a Venezuela em 1996 e outros países das Américas do Sul e Central (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001). No Brasil, foram confirmados casos em Roraima, em 1982, com isolamento de Den-1 e Den-4 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1995; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

3.2. - Dengue - Aspectos Epidemiológicos

A Dengue é uma arbovirose, manifestando-se como uma doença febril aguda, transmitida ao homem por mosquitos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). Seu agente etiológico é o vírus Dengue, da Família Flaviviridae, com 4 sorotipos antigenicamente distintos, conhecidos como DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, que causam a mesma síndrome clínica. A infecção por qualquer sorotipo confere imunidade permanente contra o mesmo e imunidade cruzada temporária contra os outros tipos. Qualquer um dos quatro sorotipos virais pode promover a evolução da doença para a forma clássica ou hemorrágica, deixando a população susceptível exposta a um maior risco de manifestação da forma hemorrágica da doença (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1995; BARBOSA, 1996).

Culicídeos do gênero *Aedes* são responsáveis pela transmissão do vírus Dengue, sendo as espécies vetoras mais importantes *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A distribuição geográfica da doença é, portanto, determinada pela dispersão do vetor (FORATTINI, 1965; SCOTT *et al.*, 1993; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; GLUBER, 1998).

Devido à sua ampla distribuição geográfica, a dengue é considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem, com um maior número de casos com hospitalização e morte (GLUBER, 1998), embora tenha sido reconhecida, por muito tempo, como uma febre benigna

sem apresentar risco de vida (MARTINS *et al.*, 1998; JACOBS, 2000). Registram-se aproximadamente 50 a 100 milhões de casos de Dengue por ano e estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas com circulação viral (RHODAIN, 1996; GLUBER, 1997).

No Brasil, a primeira epidemia do Dengue Clássico, na 2ª metade do Século XX, ocorreu no Rio de Janeiro em 1986, com circulação do DEN-1. Em 1987, os estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Alagoas, Pernambuco e Ceará, vivenciaram epidemias associadas ao mesmo sorotipo. Em 1990 foram registrados casos do Dengue Hemorrágico no Rio de Janeiro e constatada a presença simultânea de DEN-1 e DEN-2. Entre 1990 e 1992, a doença se estende aos estados de Mato Grosso e de Mato Grosso do Sul, expandindo-se rapidamente aos demais estados do território nacional (NOGUEIRA *et al.*, 1989, 1990). O DEN-3 foi recentemente isolado no Rio de Janeiro (SCHATZMAYR, 2000).

Dados de 1999 registram a presença de *Aedes aegypti* em todos os estados brasileiros, com transmissão viral estabelecida em 25 estados em 2001 (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001, NOGUEIRA *et al.*, 2001). Nos grandes centros urbanos, o perfil epidemiológico desta doença mostra uma tendência a se agravar (FIGUEIREDO *et al.*, 1991; VASCONCELOS *et al.*, 1998, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 1999), visto que a ocorrência simultânea de DEN-1 e DEN-2 na maioria dos estados, e a rápida dispersão do DEN-3, aumentam o risco de uma epidemia de Dengue Hemorrágica no País, de conseqüências imprevisíveis (SCHATZMAYR, 2000).

A epidemia da Dengue iniciada no país em 1986 expandiu-se rapidamente. Atinge nos dias atuais, até o dia 3 de março de 2009 (1ª a 6ª semana epidemiológica), - 42.956 casos notificados de suspeitos de dengue no país. Os estados com número superior a 1.000 casos notificados foram: Bahia - 9.003 (20,96%), Minas Gerais - 6.266 (14,59%), Espírito Santo - 5.955 (13,86%), Acre - 5.562 (12,95%), Goiás - 3.070 (7,15%), Rio de Janeiro - 2.297 (5,35%), Rondônia - 1.305 (3,04%), Paraná - 1.300 (3,03%), Roraima - 1.153 (2,68%), Tocantins - 1.117 (2,6%), Mato Grosso - 1.069 (2,49%). Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina continuam sem transmissão autóctone de dengue. Em relação à Febre Hemorrágica de Dengue (FHD) foram notificados oficialmente pelas Secretarias Estaduais de Saúde 66 casos, com 3 óbitos (Brasil, 2009).

Em nível Regional, as notificações dos casos, estão disseminadas da seguinte forma: Região Norte (10.871 casos); Região Nordeste (10.968 casos); Região Sudeste (14.798 casos); Região Centro-Oeste (4.939 casos); Região Sul (1.380 casos), (Brasil, 2009).

3.3. - Dengue – Transmissão

Aedes aegypti originário da África, foi introduzido na América na época da colonização, sendo transportado por navios que aportavam no novo continente. Alguns aspectos da sua biologia favorecem grandemente o contato vetor-homem, acentuando sua capacidade vetorial. As fêmeas do *Aedes aegypti* são essencialmente antropofílicas e podem realizar ingestões sanguíneas múltiplas em um único ciclo gonadotrófico. Após o repasto sanguíneo, as fêmeas repousam preferentemente no intradomicílio, até o amadurecimento dos ovos e selecionam locais para a oviposição. Os ovos são depositados individualmente em qualquer suporte próximo à superfície d'água. A cada oviposição a fêmea geralmente coloniza vários criadouros, distribuindo seus ovos em mais de um recipiente. Em condições ambientais apropriadas o desenvolvimento embrionário se completa em 48 a 72 horas, após a oviposição as larvas do primeiro estágio de desenvolvimento pós-embrionário eclodem. Sob condições desfavoráveis, os ovos entram em diapausa, permanecendo viáveis e resistentes à dessecação por um período de até 1 (um) ano, o que representa a principal característica de possibilidade de dispersão passiva destes vetores (FORATINE, 1965; CONSOLI, OLIVEIRA, 1994). Devido à possibilidade real de transmissão transovariana do vírus no mosquito, ovos em diapausa podem, quando as condições se tornam favoráveis, liberar larvas portadoras do vírus. Desta forma, pode ocorrer dispersão passiva do vírus a partir dos ovos.

O *Aedes albopictus*, originário da Ásia, foi detectado em 1986, no Rio de Janeiro, tendo sido posteriormente encontrado nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Maranhão, Paraná, Goiás, Distrito Federal, Pará e Pernambuco. Não há, entretanto dados comprobatórios de que ele esteja envolvido na transmissão de dengue no país (PONTES, RUFINO - NETO, 1994; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1995).

A malária (1989), a febre amarela (1900) e a dengue (1903) tem ciclos de transmissão similares, tendo também como vetores, dípteros hematófagos da família Culicidae. O ciclo biológico do vírus Dengue se processa necessariamente em dois hospedeiros: o homem, onde o período de viremia evolui desde o aparecimento dos sintomas até o 5º ou 6º dia da doença, e o inseto vetor, que se infecta através do repasto sanguíneo realizado neste período, tornando-se capaz de transmitir o vírus 8 a 12 dias após a ingestão e permanecendo infectado por toda a sua vida. A transmissão se processa, portanto exclusivamente através da picada do mosquito fêmea,

não havendo possibilidade de transmissão direta entre doentes ou por meio de líquidos corporais de pessoas doentes, nem por contaminação de água ou alimentos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

A densidade populacional do vetor é dependente do índice pluviométrico e da disponibilidade de recipientes com água acumulada. A crescente complexidade da urbanização desordenada, resultante do aumento da densidade demográfica; o uso cada vez maior de recipientes plásticos e embalagens descartáveis e a coleta ineficiente de lixo, contribuem para ampliar o número de criadouros de *Aedes* disponíveis nos espaços urbanos. Este cenário, em regiões com temperaturas elevadas, que aceleram o ciclo biológico do mosquito, é favorável ao crescimento populacional do vetor, fortalecendo os pilares de manutenção da transmissão viral (CONSOLI, OLIVEIRA, 1994; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1995).

A susceptibilidade ao vírus da Dengue é de natureza universal. A infecção produz imunidade permanente para o mesmo sorotipo (homóloga), enquanto que a imunidade cruzada para sorotipos diferentes (heteróloga) é temporária. Assim, a circulação simultânea de vários sorotipos, expõe uma pessoa potencialmente, a quatro ocorrências de infecção (PONTES, RUFINO - NETO, 1994; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1995; CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 1998,2001).

3.4. – Controles de Vetores Hematófagos

Desde a descoberta, há 120 anos, da transmissão de doenças ao homem por artrópodes, tem sido demonstrado que centenas de vírus, bactérias, protozoários e helmintos requerem um artrópode hematófago para transmissão entre hospedeiros vertebrados. Historicamente, do século XVII até o início do século XX, malária, dengue, febre amarela, filarioses, leishmanioses, peste, doença de Chagas, doença do sono e outras doenças veiculadas por insetos vetores, foram responsáveis por mais doenças e mortes humanas do que todas as outras causas combinadas. Programas de prevenção e controle passaram a se basear no controle vetorial, estabelecendo organizações verticalmente estruturadas, que enfatizavam a eliminação de criadouros, através da higiene ambiental (FORATINE, 1965; GUBLER, 1991). Com a descoberta dos inseticidas residuais, estes passaram a ser intensivamente usados nas décadas de 40, 50 e 60. No final dos

anos 60 as doenças veiculadas por insetos não eram mais considerados sérios problemas de saúde pública, fora da África (GUBLER, 1997).

Os benefícios dos programas de controle de doenças transmitidas por vetores tiveram, entretanto vida curta. Várias destas doenças começaram a re-emergir no início dos anos 70, um ressurgimento que se intensificou grandemente nos últimos 20 anos. Na análise deste autor, estas doenças estão re-emergindo como resultado de mudanças nas políticas de saúde pública, da resistência dos insetos aos inseticidas e de patógenos a drogas, da troca de ênfase na prevenção para a resposta emergencial e de mudanças demográficas e sociais (GUBLER, 1998).

A situação epidemiológica da dengue, instalada no país desde 1986 com claro agravamento a partir de 1994, direcionou o Ministério da Saúde a instituir o Plano para Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) a partir de 1996. Com execução prevista para o período 1996-1998 com custo avaliado em 4 bilhões de reais, o plano teve como objetivo erradicar o vetor e manter permanentemente todos os municípios do País livres da presença do mosquito, interrompendo assim a transmissão do vírus da Dengue (Secretaria Estadual de Saúde, 1997). O PEAa foi implementado com a finalidade de combater o vetor, eliminando as formas aquáticas através do uso do inseticida organofosforado Temefós e da aplicação espacial (termonebulização) em Ultra Baixo Volume (UBV) de inseticidas organofosforados ou piretróides como adulticidas.

Embora o Plano elaborado em 1995 contemplasse aspectos de altíssima relevância como a construção de esgoto sanitário e ações de educação e informação, visando a participação comunitária na eliminação de criadouros, a sua implementação enfatizou quase exclusivamente o combate direto ao *Aedes aegypti* com inseticidas. No período de 1996 a 2000, foram usadas em média, 4.937 toneladas de Temefós por ano (ZAIM, GUILLET, 2002). Este organofosforado tem sido aplicado, a intervalos de dois meses, nos criadouros de *Aedes aegypti* em todas as localidades onde é constatada a circulação viral, inclusive em caixas d'água e outros recipientes usados para estocagem de água potável para uso doméstico. O acúmulo de água em recipientes diversos é uma prática comum, em decorrência da distribuição irregular de água para consumo humano. Na maioria das cidades brasileiras estes recipientes tornam-se as principais fontes de criação de larvas do vetor do vírus da dengue. Este fato resulta em exposição humana contínua e prolongada ao organofosforado (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 1997).

Em 1999 foram registradas alterações da suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos em 9 municípios de São Paulo (MACORIS *et al.*, 1999). Segundo o Relatório Técnico de

Monitoramento da Resistência da FUNASA, em 19 dos 69 municípios investigados foi registrada resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000). A constatação de resistência, dessa população de insetos, ao Temefós levou a uma substituição progressiva deste larvicida organofosforado para o larvicida biológico da bactéria entomopatígena *Bti*. Entre 2000 e 2002 foram adquiridas para uso no Programa, cerca de 550 toneladas de *Bti* (P. Vilarinhos, comunicação pessoal).

3.5. - Uso de larvicidas à base de bactérias entomopatígenas no controle de vetores.

Programas utilizando formulações líquidas de *Bti* para controle de simulídeos foram iniciados na década de 80. Em todas as circunstâncias, o motivo que levou à rápida utilização deste entomopatígeno, foi à necessidade iminente de um agente larvicida alternativo, eficiente para o controle de populações de *Simulium* spp. resistentes aos larvicidas organofosforados, empregados extensivamente (RUAS-NETO, 1984; GUILLET, 1990; ANDRADE *et al.*, 1991). Ao nível mundial o principal programa que utiliza o *Bti* é o OCP (Onchocerciasis Control Programme), que abrange 11 países da África Ocidental. Produtos à base de *Bti* foram adotados, neste programa em rotatividade, com inseticidas organofosforados a partir de 1981, para controle de espécies do complexo *Simulium damnosum*, implicadas na transmissão da *Onchocerca volvulus*. (HOUGARD, *et al.*, 1993; BISSAN *et al.*, 1995).

O uso operacional destes biolarvicidas em grandes programas, bem como a realização de testes a campo em pequena e larga escala, em diferentes partes do mundo (África, Europa, Ásia e Américas) confirmaram a eficiência e viabilidade operacional e econômica de seu uso no controle de insetos vetores, com segurança para organismos não alvo (MULLA *et al.*, 1982; SIEGEL, SHADDUCK, 1990; BARBAZAN *et al.*, 1997; BECKER *et al.*, 2000; REGIS *et al.*, 2000).

No Brasil, dois programas baseados exclusivamente no uso de *Bti* para controle de simulídeos são desenvolvidos em São Paulo e Rio Grande do Sul. O controle de espécies de simulídeos, notadamente *S. pertinax* nestes estados, tem o objetivo de reduzir a população destes dípteros hematófagos, que causam forte incômodo à população local, comprometendo inclusive atividades agropecuárias e turísticas na região. O programa do Rio Grande do Sul foi pioneiro no uso de *Bti* no Brasil, e abrange 170 municípios da Serra Gaúcha, o que corresponde a 36,4% dos

municípios do estado (MARDINI *et al.*, 2000). No programa de São Paulo, os produtos à base de *Bti* foram introduzidos em 1986 em rotatividade com o temefós, em 4 municípios, localizados da Serra do Mar. Desde de 1990, este programa utiliza exclusivamente *Bti* (ARAÚJO-COUTINHO, 1995).

O sucesso de programas baseados predominantemente ou exclusivamente no uso de *Bti*, há mais de 15 anos, tem confirmado sua eficiência larvicida e seletividade contra espécies de mosquitos e simulídeos, além da segurança para organismos não-alvo (MULLA *et al.*, 1982; SIEGEL; SHADDUCK, 1990). O KABS, programa realizado no Vale do Rio Reno na Alemanha, foi estabelecido com o objetivo de controlar populações de mosquito, principalmente *Aedes vexans*, *Aedes stictus* e *Aedes rossicus*, devido ao grande incômodo causado por suas picadas. Neste programa são tratados com larvicidas aproximadamente 300 km de extensão ao longo do rio, com 600 km² de áreas de inundação, considerados sítios preferenciais de desenvolvimento das formas jovens das espécies citadas. Estima-se que 170.000 hectares tenham sido tratados com produtos à base de *Bti*, entre 1981 e 1999, totalizando um consumo de 55 toneladas de pó molhável e 30.000 litros de concentrado líquido. Com os avanços na área tecnológica, outros tipos de formulação, como grânulos e cubos de gelo, foram incorporados ao programa e representaram ganhos em termos de persistência da atividade larvicida, sobretudo em áreas com vegetação densa (BECKER, 2000).

O uso de produtos contendo esporos viáveis de *Bti* em água potável sofreu restrições por parte da Organização Mundial de Saúde por insuficiência de provas experimentais de sua inocuidade à saúde humana. Mas desde 1991 a Organização Mundial de Saúde recomenda a utilização de produtos contendo cristais e esporos viáveis, em formulação apropriada a este tipo particular de criadouro (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999).

Nas duas últimas décadas, tem se observado um aumento progressivo do número de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (*Bti*), disponíveis no mercado internacional (Tab.1). Estima-se que o consumo destes produtos deve aumentar consideravelmente, sobretudo devido ao impacto ambiental causado pelo uso de inseticidas químicos.

Tabela 1 – Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* disponíveis no mercado internacional. (Modificado de SILVA, 2000 e BECKER, 2000).

Nome Comercial	Formulação	Fabricante	Potência declarada
Acrobe®	Granulado	American Cyanamid/USA	200 UTI/mg
Aquabac®	Pó molhável	Becker Microbial/USA	7.000 UTI/mg
Aquabac®	Suspensão aquosa	Becker Microbial/USA	1.200 UTI/mg
Aquabac®200G	Granulado	Becker Microbial/USA	200 UTI/mg
Bactimos®	Pellets	Abbott/Sumitomo/USA	200 UTI/mg
Bactimos® FC	Suspensão concentrada	Abbott/Sumitomo/USA	600 UTI/mg
Bactimos® WP	Pó molhável	Abbott/Sumitomo/USA	3.500 UTI/mg
Bactimos®GR	Granulado	Abbott/ Sumitomo/USA	200 UTI/mg
Bactivec®	Suspensão aquosa	Labiofan/ Cuba	1.130 UPCQ/mg ³
Bactulicid	Pó molhável	I.M. Pushkin/ Leningrado	100 x10 ⁹ esp./g ⁴
Biotouch®	Concentrado aquoso	Zohar Dalia/ Israel	1.000 UTI/mg
Bt-horus ® SC	Suspensão Concentrada	Bthek/Brasil	1.200 UTI/mg ¹
Culinex®	Comprimido efervescente	Gmbh/ Alemanha	8.000 UTI/mg
Mosquito Dunks®	Biscoito efervescente	Summit Chemical/USA	7.000 AAU/mg ²
Teknar®	Pó molhável	Thermo Trilogy/USA	>10.000 UTI/mg
Teknar®	Suspensão concentrada	Thermo Trilogy/USA	3.000 AAU/mg
Teknar®G	Granulado	Thermo Trilogy/USA	200 UTI/mg
VectoBac®AS	Suspensão aquosa	Abbott/Sumitomo/USA	1.200 UTI/mg ¹
VectoBac®GR	Granulado	Abbott/Sumitomo/USA	200 UTI/mg
VectoBac®WDG	Grânulos dispersíveis em água	Abbott/ Sumitomo/USA	3.000 UTI/mg
VectoBac®WP	Pó molhável	Abbott/ Sumitomo/USA	5.000 UTI/mg

¹ UTI unidade tóxica internacional

² AAU: unidades de potência determinada contra larvas de 2º estágio de *Aedes aegypti*.

³ UPCQ: unidades de potência determinada contra larvas de *Culex quinquefasciatus*.

⁴ Esporos/grama (medida de potência obsoleta)

3.6. - Uso de Praguicidas no controle de vetores

Produtos químicos são usados sistematicamente pelo homem no seu espaço doméstico, na agricultura e em campanhas de saúde pública. Segundo Liber (1991), cerca de 15.000 formulações químicas são utilizadas como preservativos de alimentos, desinfetantes, herbicidas e praguicidas (ditos inseticidas, acaricidas, fungicidas, moluscicidas, raticidas, etc), das quais só cerca de 8.000 formulações são licenciadas. Os chamados inseticidas – termo impróprio, visto que não são específicos para insetos – representam o maior volume. Entre estes, os mais utilizados são os organofosforados (ésteres dos ácidos fosfóricos e tio fosfóricos), sendo responsáveis pelo maior número de mortes atribuídas aos inseticidas (TAYLOR, 1991).

O uso continuado ou intermitente, durante quase 6 décadas, de milhares de toneladas de tais compostos, em sistemas agrícolas, florestais e urbanos, tornou evidentes sérios problemas, decorrentes i) da inespecificidade de seu modo de ação, sendo indiscriminadamente tóxicos para invertebrados e vertebrados, causando impacto ambiental e desequilíbrio do ecossistema, ao eliminar organismos alvo e não alvo ii) do fato de agirem sobre um único sítio-alvo nos organismos, funcionando como pressão de seleção de resistência em populações de insetos (TAYLOR, 1991; LARINE, 1999). O surgimento de resistência ao Dicloro – Difenil – Tricloroetano (DDT) levou, aliás, não a uma análise crítica e busca de soluções adequadas, mas a ações agravantes, como o aumento das doses aplicadas, e ao desenvolvimento e produção de novas moléculas resultando na sequência de diferentes classes de moléculas tóxicas: outros organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, todos igualmente não seletivos e capazes de induzir resistência nos insetos. Embora algumas análises dos danos causados pelo uso destes compostos à saúde humana tenham sido feitas (em sua maioria restrita aos efeitos agudos), caracterizando um problema de Saúde Pública, a extensão destes danos é pouco conhecida, sobretudo no que concerne aos efeitos crônicos.

O Brasil destaca-se, ao nível mundial, como um dos maiores consumidores de inseticidas, principalmente para uso agrícola. Há várias décadas estes compostos químicos vêm sendo utilizados em Campanhas de Saúde Pública para o controle de vetores, iniciando com o grande programa Global de Erradicação da Malária, lançado em 1955, no qual foi empregada, mundialmente, enorme quantidade do organoclorado DDT, no combate a espécies de *Anopheles*. Este programa teve seu ápice entre 1961-1962 e, em virtude da resistência dos insetos ao DDT,

entre outros fatores, houve um recrudescimento global da ocorrência de malária, a partir do início da década de 70. Os organoclorados foram sendo substituídos por outras classes de moléculas, os organofosforados, os carbamatos e os piretróides, que são utilizados até o presente no combate a insetos vetores (BROWN, 1951; FORGET 1991, EYER, 1995; PADILHA, 1995).

Segundo dados da Secretaria de Política Agrícola do Ministério da Agricultura e Abastecimento, no ano de 1995 foram comercializados aproximadamente US\$ 1,6 bilhão (um bilhão e seiscientos milhões de dólares) em inseticidas utilizados em Campanhas de Saúde Pública (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). É importante ressaltar que estes dados são anteriores à implementação do PEAa, que vem utilizando inseticidas no combate ao *Aedes aegypti* em todos os municípios com circulação viral, desde 1996.

Dentre os organofosforados o inseticida teméfós foi empregado no controle do transmissor do vírus da Dengue, o *Aedes aegypti*. O teméfós, em formulações conhecidas como Abate, Difos, Biothion, Abathion, Nimitex e Swebate é um pesticida organofosforado usado extensivamente em várias partes do mundo contra vetores biológicos de diversas doenças, foi introduzido no mercado em 1965 pela American Cyanamid Company. Inicialmente foi usado no controle de mosquitos pertencentes ao gênero *Simulium* e outros insetos com fase larval aquática (GAINES, 1969).

Foi o pesticida mais utilizado no Brasil entre os anos de 1967 a 1998, no controle do vetor da dengue e febre amarela, o *Aedes aegypti*. Empregado como larvicida em água estagnada, na concentração de 1% e em reservatórios na concentração final de 1ppm (NOBRE, 1998). Apresenta algumas vantagens em relação a outros pesticidas também utilizados no controle de mosquitos, uma delas é a pouca persistência ambiental relativa aos hidrocarbonetos clorados. É aplicado em intervalos de dois meses, nos criadouros de *A. aegypti* em todos os municípios com circulação viral, desde 1996, inclusive em caixas d'água e outros recipientes usados para estocagem de água potável para uso doméstico, sendo as principais fontes de criação de larvas do vetor. (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1995; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000).

AUGUSTO *et al.*, (1997) ao avaliar os aspectos sócio-econômicos do PEAa, inferiu que o uso de produtos químicos como base principal do programa, além de ineficaz, consome enormes somas de recursos e ainda causam danos cujos custos ambientais e sociais não são internalizados nas análises de custo-benefício destes programas. No período de 1996 a 2000 foram usadas, em

média, 4.937 toneladas deste inseticida por ano (ZAIM; GUILLET, 2002). Apenas na área urbana da cidade do Recife PE, com 1,3 milhão de habitantes e cerca de 516.000 imóveis distribuídos em 209 km², foi utilizado em cada ciclo de tratamento (6 ciclos anuais), 20 toneladas de temefós no tratamento focal, em visitas domiciliares, inclusive em depósitos de água acumulada para uso doméstico, envolvendo cerca de 30.000 trabalhadores na manipulação do inseticida (PERNAMBUCO, 1997; AUGUSTO *et al.*, 1997). Tendo sido substituído, a partir de 2002, o uso do organofosforado temefós pelo larvicida biológico *Bti*, na área urbana do Recife (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

3.6.1. – Genotoxicidade dos Praguicidas Sintéticos

Novas moléculas químicas são introduzidas anualmente no mercado de consumo, sendo amplamente utilizados do ponto de vista de extensão e quantidade. Por sua importância toxicológica, têm sido alvo de estudos para avaliar efeitos genotóxicos, neurotóxicos e imunotóxicos tardios (BHATIA; KAUR, 1993; BARNET; RODGERS, 1994). Os agrotóxicos, por exemplo, constituem uma categoria de produtos, ou de misturas químicas, largamente utilizados no armazenamento de alimentos, produção agrícola, beneficiamento de madeiras e outros usos, tanto na área rural como urbana. Diversos deles são utilizados no controle de vetores, em programas de Saúde Pública. Tanto os ingredientes ativos como os inertes participantes do processo de produção (matérias primas, resíduos finais, impurezas e aditivos para formulação), constituem uma grande preocupação pelo impacto sobre a saúde e meio ambiente, em razão da sua toxicidade e permanência no meio ambiente, vários deles são bioacumulativos, penetrando na cadeia alimentar e por apresentarem efeito mutagênico, teratogênico e carcinogênico, comprovadamente para animais e suspeitos para humanos (FORGET, 1991; AUGUSTO, 1995, 1997).

A avaliação toxicológica de um composto praguicida compreende o estudo dos dados toxicológicos do composto puro, do produto técnico e de suas formulações, em animais de laboratório e em outros quaisquer sistemas de provas (ANWAR, 1997; LARINE, 1999). A avaliação do risco do composto engloba um estudo qualitativo e quantitativo, onde são considerados os dados toxicológicos, o tipo de dano provocado, as doses utilizadas e os efeitos correspondentes, bem como os dados de exposição e de eficácia, para inferir o grau de segurança

do composto praguicida e de outros componentes constituintes da formulação técnica, disponíveis no mercado de consumo (LARINE, 1999).

A Comissão Internacional para a Proteção Contra Mutagênicos e Carcinogênicos (ICPEMC), reforça a necessidade de se avaliar as possíveis ações mutagênicas induzidas por compostos químicos presentes em nosso meio, em virtude da correlação existente entre mutagenicidade e carcinogenicidade. Entre a diversidade dos testes mutagênicos, existe uma característica e um objetivo comum, que é a probabilidade de se inferir os resultados para o homem (MATTER; TSUCHIMOTO, 1980; ADLER, 1984; BRUSICK, 1987, 1994; ASHBY, 1994). A revisão da literatura mostra que, para certas substâncias, existem dados suficientes para a sua classificação como cancerígeno para humanos, dentro dos requisitos adotados pelas agências internacionais credenciadas, como a Internacional Agency of Research on Cancer-IARC, enquanto que, para outras, há carência de estudos ou de evidências suficientes, pelas técnicas adotadas (ENVIROMENTAL, 1986; ASHBY, 1994; AUGUSTO, 1997).

O efeito carcinogênico de muitos pesticidas está bem determinado em animais, porém a insuficiência de dados Epidemiológicos impede a sua classificação como mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos para humanos, embora para alguns deles, em razão de situações acidentais de grande proporção, foi possível estabelecer estas relações, como no caso de alguns organoclorados (AUGUSTO, 1995; ANWAR, 1997).

Entre os inseticidas, os organofosforados são os mais utilizados. Sua ação tóxica resulta do fato de que estes compostos são potentes inibidores de colinesterase. Esta inibição se produz através da fosforilação de esterases, um efeito que é remarcável no caso da acetilcolinesterase, enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina. O resultante acúmulo de acetilcolina no organismo acarreta alterações no funcionamento dos sistemas endócrino, muscular e nervoso (FORGET 1991; FLESSEL, 1993; EYER, 1995).

Para a maioria dos organofosforados, a exposição dérmica e subsequente absorção através da pele, representam a via de entrada de maior importância sem, entretanto, minimizar a via oral e respiratória. Na exposição dérmica, aparecem sinais e sintomas de intoxicação aguda 3 a 4 horas após o contato. As vias orais e respiratórias dependem de circunstâncias especiais. A intensidade dos sintomas varia de acordo com o composto. Muitos destes compostos são rapidamente metabolizados e excretados e, portanto, nestes casos, efeitos sub-crônicos e crônicos normalmente não ocorrem (RICHARDSON, 1995). Os efeitos adversos (agudos, subagudos e

crônicos) sobre a saúde dos indivíduos expostos a esses agentes são relevantes e, em geral, mal caracterizados (AUGUSTO, 1995).

3.7. – Inseticidas Biológicos: *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (*Bti*)

O *Bti* utiliza em seu crescimento vegetativo fontes de carboidratos para a síntese de proteínas. Forma um corpo paraesporal contendo inclusões protéicas na forma de cristais durante a fase de esporulação, que apresentam atividade inseticida (ICP ou endotoxinas) (DE BARJAC, 1978).

Os cristais protéicos são compostos por quatro polipeptídeos principais que apresentam 135 kDa (Cry4Aa), 125 kDa (Cry4Ba), 68 kDa (Cry11Aa) e 28 kDa (Cyt1Aa), e estão sob a forma de protoxinas (FEDERICI *et al.*, 1990).

O modo de ação de *Bti* se processa pela ingestão de esporos e cristais protéicos por larvas suscetíveis. Uma vez ingeridos, os cristais são solubilizados no lume intestinal, em pH alcalino, liberando as protoxinas, que são clivadas por enzimas proteolíticas (tripsina e quimiotripsina) em fragmentos menores, tornando-se toxinas ativas (CHARLES, 1983). Estas toxinas ativas passam pela membrana peritrófica e interagem com a porção apical do epitélio do intestino médio da larva, dando início à formação de poros ou canais (LAHKIM-TSROR *et al.*, 1983), os quais provocam distúrbios na regulação do potencial elétrico trans-membrana, causando lise colóide-osmótica das células do epitélio intestinal (CHARLES, 1981; KNOWLES; ELLAR, 1987).

As toxinas interagem especificamente com receptores da membrana apical do intestino médio, causando sérios danos ao epitélio, que culminam com a morte da larva (CHARLES, 1981; GILL *et al.*, 1992). A atividade tóxica do *Bti* é decorrente do sinergismo entre as toxinas, para a completa expressão da toxicidade (WU; CHANG, 1985; ANGSUTHANASOMBAT *et al.*, 1992; PONCET *et al.*, 1995), atingindo a toxicidade máxima e morte das larvas, no período de 24 horas (GILL *et al.*, 1992; CRICKMORE *et al.*, 1995).

Os primeiros sintomas externos de intoxicação aguda podem ser observados 20 minutos após a ingestão (HABIB *et al.*, 1998), podendo ser observados: perda gradual da mobilidade, interrupção da alimentação, convulsões progressivas que indicam comprometimento do sistema neuromuscular, encurvamento do corpo e permanência por períodos mais prolongados no fundo dos recipientes (HABIB *et al.*, 1998).

Os danos sofridos pelo epitélio favorecem a mistura do conteúdo intestinal com a hemolinfa, propiciando meio adequado ao crescimento vegetativo dos esporos germinados de *Bti*. A proliferação destes na hemocele pode causar septicemia, acelerando a mortalidade da larva. O tempo requerido para expressão máxima de toxicidade é de 24 horas após a ingestão do patógeno (GILL *et al.*, 1992). (Figura 1)

Estudos sobre a toxicidade do *Bti* demonstram, na maioria das circunstâncias, sua inocuidade para a fauna não-alvo encontrada nos criadouros de mosquitos, salvo para algumas espécies de quironomídeos (GARCIA *et al.*, 1980; ALI, 1981; MULLIGAN *et al.*, 1980).

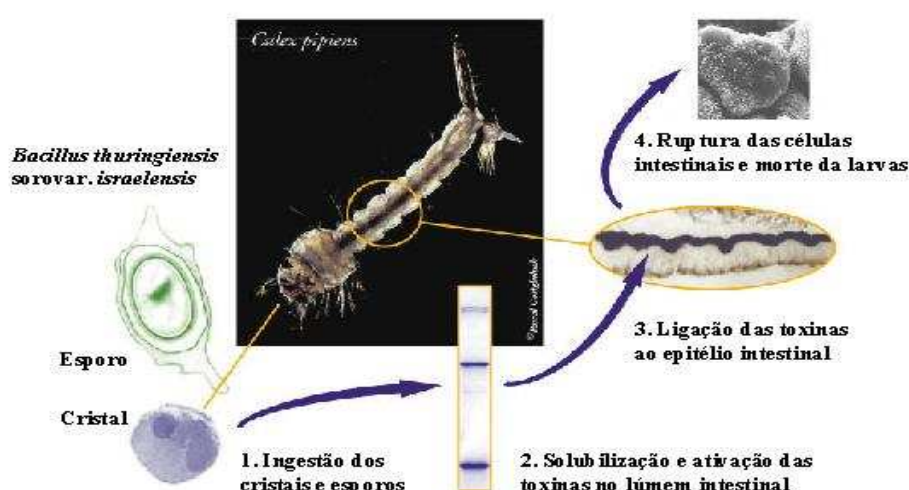


Figura 1. Representação esquemática do modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* em larva de mosquito. Fonte: Regis *et al.* (2001), com modificações.

3.8. - Mutação

As mutações resultam de qualquer mudança hereditária ou induzida na sequência ou no número de nucleotídeos do DNA em células somáticas ou germinativas. Em geral estas mudanças levam à expressão de proteínas estruturais ou enzimas com funções alteradas, podendo ser prejudiciais para o indivíduo. Entretanto nem sempre são deletérias, sendo consideradas como a principal fonte de variabilidade, contribuindo assim para a construção de novas informações genéticas. Podem ter origem espontânea, proveniente de erro metabólicas, ou induzidas por causas diversas, incidindo diferentes mecanismos moleculares de reparação celular (SNUSTAD; SIMONS, 2000; ROUSE; JACKSON, 2002; SARASIN, 2003).

As desordens genéticas levam muitas vezes à hipótese de que essas alterações sejam devidas a efeitos externos de agentes físicos ou químicos, mas se faz necessário considerar outros fatores como: ativação metabólica, processo de detoxificação de compostos químicos, vários sistemas de reparo, assim como o efeito do mutageno na fisiologia celular (FARAH, 1997; KLASSEN; WATKINS III, 1999).

Mutações no DNA nuclear ou mitocondrial, de células somáticas, são de relevância não somente em estudos de carcinogênese, como também em processos patológicos cardiovasculares, distúrbios metabólicos e neurológicos. (BHATIA; KAUR, 1993; VIJG; GOSSEN, 1993). As mutações somáticas são importantes não apenas na propensão do desenvolvimento do câncer, mas, sobretudo, no que diz respeito a sua origem monoclonal, com o surgimento de um tumor a partir de uma única célula inicialmente transformada. O primeiro passo seria o envolvimento de mutações que incidem nos genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular (CAIRNS, 2002; SARASIN, 2003).

Além dos efeitos oncogênicos, somam-se os efeitos teratogênicos e os hereditários abrangendo os congênitos perceptíveis já ao nascimento, através da linhagem germinativa nas gerações seguintes, e aqueles decorrentes de mutações somáticas sutis, porém deletérias e irreversíveis, que se acumulam no reservatório genético humano (SNUSTAD; SIMONS, 2000). É cada vez mais evidente que o câncer é consequência da interação química com o material genético, o qual tem um papel significativo na interação com os demais fatores determinantes da doença. No caso dos cancerígenos, sabe-se que o reparo celular é duvidoso e depende de muitos mecanismos, que ainda estão em estudos (ROSS, 1997; KLASSEN; WATKINS III, 1999).

A carcinogenicidade e a mutagenicidade apresentam muitos aspectos em comum. Muitos materiais carcinogênicos são reconhecidamente mutagênicos, como substâncias presentes no fumo, os raios-x, a radiação ultravioleta, arbestos e outros. Compostos químicos reconhecidamente cancerígenos são em sua maioria positivos, quando testados em ensaios que medem a mutagenicidade, como o teste de Ames, enquanto que, drogas reconhecidamente não cancerígenas, em geral não são mutagênicas (AMES, 1979, 1989; MARON; AMES, 1983; LIJINSKY, 1989; AMES; GOLD, 2000).

Na grande maioria, os agentes químicos que induzem câncer, são mutagênicos e/ou genotóxicos. Quebras na molécula do DNA parece ser a principal causa do processo cancerígeno (BRUSICK, 1987, 1992, 1994). Há propensão genética ao câncer, em função da herdabilidade de mecanismos celulares de reparação deficientes; da herdabilidade de certos tipos de câncer, reconhecíveis por aberrações cromossômicas; e dos genes oncogênicos, que uma vez alterados por mutações, são capazes de gerar um tumor a partir de uma única célula (FARAH, 1997; ROSS, 1997).

A proliferação celular descontrolada é um fator comum a todos os processos cancerígenos. Inicialmente pensou-se que o mecanismo molecular pelo qual ocorria a descontrolada proliferação celular fosse proveniente de produtos gênicos e do modo como eles se relacionavam com o crescimento da célula. Verificou-se depois que o produto gênico de vários oncogenes é uma enzima - a cinase protéica -, que fosforila aminoácidos aumentando pelo menos dez vezes o processo de fosforilação em uma célula cancerígena. Com a descoberta dos oncogenes através dos retro vírus, verificou-se que quando um vírus portador de um oncogenes invade uma célula, o padrão de crescimento desta célula torna-se descontrolado, originando diferenciação celular em células neoplásicas (VIJG; GOSSEN, 1993; LOEB, 2001; LOEB *et al.*, 2003).

3.8.1. – Monitoramento Biológico na Aferição da Genotoxicidade

A comprovação científica da origem mutacional de vários tipos de câncer oriundos do efeito genotóxico de substâncias químicas, e o aumento do risco de exposição a poluentes e substâncias tóxicas, levaram à necessidade de se desenvolver testes que permitiam avaliar o potencial mutagênico de substâncias diversas (AMES, 1979, 1989; AMES; GOLD, 1989; NATARAJAN, 2002; OBE *et al.*, 2002).

Atualmente dispõe-se de centenas de ensaios para a aferição da genotoxicidade. Tais testes empregam diferentes modelos como fagos, bactérias, algas, fungos, leveduras, insetos, células de mamíferos e de roedores. Entre os parâmetros para aferir a mutagenicidade, *in vitro* ou *in vivo*, estão a reversão à prototrofia, alterações citogenéticas e expressão de genes letais (HOLLSTEIN; MCCANN, 1979; MARON; AMES, 1983; NATARAJAN; OBE, 1986; MÉLO; FERREIRA, 1990; MÉLO, 1996, 1997).

Os testes para aferição da genotoxicidade têm sido introduzidos para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas, bem como, o seu potencial carcinogenético. Danos cromossômicos têm particular relevância para os seres humanos, posto que um número significativo de doenças genéticas seja relatado como decorrente de anormalidades na estrutura ou no número dos cromossomos. Desta forma, esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de métodos capazes de detectar, rapidamente, agentes clastogênico (PRESTON, *et al.*, 1981, 1987, 1987A; SPERLING, 1984; SAVAGE, 1988; LEGATOR, 1991).

As técnicas de análise molecular, que revelam as alterações no DNA e alterações na expressão gênica, estão sendo cada vez mais utilizadas na tentativa de constituírem marcadores biológicos para estudos Epidemiológicos e ações de prevenção (CARANO; NATARAJAN, 1988; HEMMINSKI, 1992). Atualmente está definido que as técnicas moleculares aplicadas ao DNA e à proteína “adduct” (macromolécula modificada, produzida quando um agente químico ou seu metabólito liga-se covalentemente com ácidos nucleares), podem ser úteis na definição dos níveis críticos da ação de compostos químicos, ao passo que as análises citogenéticas revelam o efeito genotóxico (clastogênico) causado pelas exposições a agentes químicos, suspeitos de efeito carcinogênico e genotóxico (HOLLSTEIN *et al.*, 1979; PRESTON *et al.*, 1981, 1987; BRUSICK *et al.*, 1992).

Nos últimos 40 anos, a administração de agentes químicos a ser avaliados em animais de laboratório, em geral roedores, tem sido o método considerado mais preciso para a aferição da genotoxicidade (clastogenicidade), particularmente a carcinogenicidade (ADLER, 1984; NATARAJAN; OBE, 1986; BRUSICK, 1987).

Ensaios citogenéticos podem ser usados para monitorar populações expostas a um grande número de clastogênos ocupacionais e ambientais (GARRETT, 1992; ASHBY, 1994; CAVALIERE *et al.*, 1996; AUGUSTO, 1997).

É de suma importância que estes ensaios façam parte de baterias de testes usados em avaliações de quaisquer agentes indutores de mutagenicidade. Os parâmetros citogenéticos que podem ser estudados incluem as aberrações cromossômicas, a troca de cromátides irmãs e os micronúcleos. Os testes propostos têm como objetivo a análise citogenética de cromossomos de células da medula óssea ou de linfócitos de sangue periférico, e já estão bem estabelecidos do ponto de vista metodológico (VON LEBEDUR; SCHIMID, 1973; SCHMID, 1975; MATTER; TSUCHIMOTO, 1980; PRESTON *et al.*, 1981; HSU; PATTON, 1996).

3.8.2. – Determinação da Genotoxicidade: Testes Citogenéticos

Está atualmente definido que o DNA e a proteína “adduct” podem ser úteis na definição dos níveis críticos da ação de compostos químicos (BURNS; BOTTINO, 1991; ROSS, 1997) ao passo que, as análises citogenéticas e de mutação revelam o efeito causado pelas exposições a agentes químicos, suspeitos de efeito carcinogênico e genotóxico (LIJINSKY, 1989; HEMMINSKI, 1992).

Compostos químicos de uso ocupacional, vinte entre dez testados, foram classificados como de ação genotóxica e muitos deles apresentaram evidências de risco para o câncer. Os “endpoints” citogenéticos (aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos) já estão sendo extensivamente utilizados em monitoramento de risco de câncer ocupacional (DULOUT, 1985; DEFERRARI *et al.*, 1991; CAVALIERE, 1996).

Os testes citogenéticos foram introduzidos para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas e o seu potencial genotóxico (clastogênico). As análises citogenéticas são realizadas através do monitoramento, nas células em metáfase, das aberrações cromossômicas oriundas de quebra nos cromossomos ou cromátides, rearranjos ou perda de fragmentos de cromossomos inteiros ou parte deles (SCHMID, 1975; PRESTON *et al.*, 1981, 1987; SAVAGE, 1988).

Nos ensaios citogenéticos *in vitro*, usando linfócitos de sangue periférico para a detecção de aberrações cromossômicas estruturais, alterações numéricas, trocas entre cromátides irmãs e pesquisa de micronúcleos, são os procedimentos melhor estabelecidos para a avaliação dos efeitos genotóxicos de drogas sobre as células de mamíferos (MOOHEAD *et al.*, 1960; FENECH; MORLEY, 1984), no entanto, este tipo de teste tem como grande restrição a ausência

de processos metabólicos que ocorrem apenas *in vivo* (MATTER; TSUCHIMOTO, 1980; CARANO; NATARAJAN, 1988).

Os testes citogenéticos *in vivo* realizados em roedores, são os que mais se aproximam de um ideal no que se refere à avaliação de agentes genotóxicos (clastogênicos), e sua extrapolação para o homem, destacando-se os testes de metáfase e de micronúcleo em células de medula óssea de camundongos. A proximidade filogenética, a natureza das células, a presença de processos fisiológicos normais do animal atuando na absorção, distribuição, ativação e excreção da droga, fazem destes testes os paradigmas dos ensaios toxicológicos e genotóxicos (MATTER; TSUCHIMOTO, 1980; NATARAJAN; OBE 1986; SAVAGE *et al.*, 1988).

O teste de metáfase é baseado na detecção de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongo. A detecção dos danos cromossômica, através de ensaios citogenéticos, *in vivo* e *in vitro*, tem particular relevância para os seres humanos, posto que, um número significativo de doenças genéticas é relatado como decorrente de anormalidades na estrutura ou no número dos cromossomos. A análise citogenética de cromossomos já está bem estabelecida do ponto de vista metodológico, assim como, têm se revelado ser mais sensíveis para evidenciar o efeito genotóxico (clastogênico). Este tipo de teste, na prática, consome muito tempo e requer observadores altamente preparados (ZAMBRANO *et al.*, 1982; NATARAJAN; OBE, 1986; SAVAGE, 1988; HSU; PATTON, 1996).

O teste de micronúcleo, um teste rápido desenvolvido por Von Ledebur; Schmid, 1973 e Heddle *et al.*, 1983, é mundialmente utilizado para a detecção de agentes genotóxicos, com especial relevância para os programas de *screening* na vigilância à saúde, tendo sido apontado como um método para determinar a capacidade clastogênica de uma substância e, conseqüentemente, seu potencial carcinogênico. O procedimento técnico e a utilização do teste foram padronizados pelo “Collaborative Study Group” (1986, 1992).

Devido a sua relativa simplicidade e especificidade, o teste de micronúcleos é freqüentemente utilizado em investigações de clastogenicidade em ensaios *in vivo* (HEDDLE 1973; SCHMID, 1975; HIRAI, 1991; HAYSHI *et al.*, 1994). Ele pode também ser feito *in vitro* com células de mamíferos em cultura, como por exemplo, a cultura de linfócitos de sangue periférico humano (MOOREAHEAD *et al.*, 1960; FENECH; MORLEY, 1984; HÖGSTEDT; KARLSSON, 1985).

Os estudos iniciais com aplicação do teste de micronúcleos foram realizados em animais de laboratório, principalmente camundongos, ratos e hamsters (Heddle (1973) e Schmidt, (1975). O teste está baseado nos seguintes princípios e observações: na anáfase, cromátides acêntricas e fragmentos de cromossomos se afastam do fuso mitótico, e no final da mitose são transformados em um ou mais núcleos secundários, no citoplasma das células filhas, menores do que os núcleos principais, sendo denominados de “micronúcleos”. Ao terminar a última mitose, do 1º ciclo celular, os núcleos são expulsos e por razões ainda desconhecidas, os micronúcleos são fixados no citoplasma da célula filha, facilitando a sua identificação. Esta aberração pode ocorrer devido a defeitos no fuso mitótico ou no centrômero, dificultando a fixação do cromossomo nos túbulos do fuso (HEDDLE *et al.*, 1983; FENECH; MORLEY, 1984; HAYSHI *et al.*, 1994).

4 – ARTIGO PUBLICADO

ARTIGO ORIGINAL/ ORIGINAL ARTICLE

Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos**Mutagenic effects of the organophosphate insecticide temephos on mice bone marrow cells**

RIALA6/1175

Maria Eliane Bezerra de MÊLO^{1*}, Kleison da Costa MERLO¹, Raul Rodrigo de Carvalho FERNANDES¹, Carlos Feitosa LUNA¹, George Tadeu Nunes DINIZ¹, Maria Teresa Janssen de Almeida CATANHO², Leda REGIS¹

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE/Brasil. Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, CEP 50670-420, Recife, PE/Brasil. e-mail: melomeb@cpqam.fiocruz.br
TEL/FAX: 0**81 2101-2578 / 0**81 2101-2640

²Centro de Ciências Biológicas / Depto. Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, CEP 50670-420, Recife, PE/Brasil. TEL/FAX: 0**81 2126-8355 / 0**81 2126-8869

Recebido: 15/08/2008 – Aceito para publicação: 24/10/2008

RESUMO

Foram investigados os efeitos mutagênicos do organofosforado temefós através da observação da formação de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (PCEMN) da medula óssea de camundongos. Em camundongos *Swiss Webster* de ambos os sexos, foram administradas diferentes doses de temefós (27,75; 55,5 e 111,0 mg/kg) por via bucal-gástrica e água destilada (10 mL/kg) no grupo controle negativo; e ciclofosfamida (CPA) (25 mg/kg) foi administrada pela via i.p. no grupo controle positivo. Foram analisadas dez mil células da medula óssea por grupo experimental. Os efeitos mutagênicos foram avaliados nos períodos de 24, 48 e 72h após administrar a dose única e após nove doses de 111,0 mg/kg (1/semana). Em 24h após a dose única de CPA, a formação de PCEMN foi observada em 1,63% dos camundongos machos e 2,77% em fêmeas. Não houve formação de PCEMN no grupo controle negativo. O temefós induziu PCEMN em 2,61%, 3,50% e 3,69% de animais machos e 1,02%, 1,37% e 1,33% em fêmeas. Após 72h, CPA induziu PCEMN em 0,05% de camundongos de ambos os sexos e o temefós em 0,92% de machos e 0,18% em fêmeas. Após nove doses de CPA, houve a formação de PCEMN em 0,15% de machos e em 0,8% de fêmeas; para o temefós, os valores observados foram respectivamente de 0,53% e 0,11%. A ação mutagênica de temefós foi demonstrada pela indução de micronúcleos em camundongos de ambos os sexos.

Palavras-chave: temefós, organofosforado, mutagênico, teste de micronúcleo, eritrócitos policromáticos micronucleados.

ABSTRACT

The mutagenic effects of organophosphorate temephos on mice bone marrow cells was investigated through the micronucleus formation test. Doses of temephos (27.75; 55.5 e 111.0 mg/kg) were orally administered to males and females *Swiss Webster* mice. Cyclophosphamide (CPA, 25 mg/kg) per via i.p. and water (10 mL/kg) were administered in mice as positive and negative control groups, respectively. Mutagenic effects were evaluated from 24h to 72h after giving a single dose, and after nine doses of 111.0 mg/kg weekly administered. Ten thousand bone marrow cells per experimental group were analyzed. In the positive controls, the percentages of polychromatic erythrocytes micronucleus (PCEMN) at 24h after a single dose were 1.63% in male and 2.77% in female mice. No PCEMN was observed in the negative controls group. Gradually increasing temephos doses induced PCEMN in 2.61, 3.50, and 3.69% males and 1.02, 1.37, and 1.33% females, respectively. After 72h, CPA caused 0.05% of PCEMN in both males and

Melo, MEB et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 67(3):196-201, 2008.

females; and the temephos caused 0.92% in males and 0.18% in females. In mice administered with nine doses of CPA, PCEMN was detected in 0.15% males and 0.8% females, although PCEMN values were significantly higher in temephos receiving mice group. The mutagenic effects of temephos on both male and female mice were evidenced by chromosome alterations inducing micronucleus formation.

Key words. temephos, organophosphate, mutagenic, micronucleous test, micronucleate Polychromatic erythrocytes.

INTRODUÇÃO

O Brasil é, em nível mundial, um dos maiores consumidores de inseticidas, os quais são usados principalmente na agricultura^{1,2}. O uso continuado ou intermitente durante quase 6 décadas de milhares de toneladas de tais compostos, acarretou problemas decorrentes do seu modo de ação não seletiva, ao eliminar organismos alvo e não alvo, tanto invertebrados quanto vertebrados, causando impacto ambiental e desequilíbrio nos ecossistemas^{3,4,5}.

Há décadas, inseticidas químicos vêm sendo largamente utilizados para o controle de insetos transmissores de doenças^{1,2}. Desde a implantação do Plano para Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAA) o uso de organofosforados em programas de saúde pública no Brasil foi ampliado consideravelmente pela adição de cerca de 5 mil toneladas de temefós por ano^{3,4,5}. Este composto é aplicado como larvicida, em ciclos bimestrais, em água estagnada e em reservatórios de água potável para uso doméstico, na concentração final de 1ppm. A adição de temefós em água para consumo humano tem como argumento baixa toxicidade aguda e a pouca persistência no ambiente^{6,7}.

O temefós, empregado como princípio ativo de produtos como Abate, Difos, Biothion, Abathion, Nimitex e Swebate, é um pesticida organofosforado usado extensivamente em várias partes do mundo no controle de vetores biológicos de diversas doenças e foi introduzido no mercado em 1965, pela American Cyanamid Company.

Análises dos danos causados pelo uso de compostos organofosforados à saúde humana têm sido, em sua maioria restrita aos efeitos agudos, entretanto sabe-se que os inseticidas sintéticos não são seletivos, agredem o meio ambiente e apresentam efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre invertebrados e vertebrados, resultantes da exposição prolongada a diferentes moléculas de organofosforados, caracterizando, portanto um problema de Saúde Pública^{8,9,10}.

Os organofosforados são inibidores de colinesterase ativos em todos os grupos animais que usam a acetilcolina como neurotransmissor, com conseqüente acúmulo desta molécula no organismo, acarretando, cronicamente, alterações no funcionamento dos sistemas muscular, nervoso, endócrino e imunológico^{11,12,13,14}. Os efeitos agudos da exposição a estes compostos são mensurados em modelos animais, estabelecendo-se a dose letal de 50% (DL₅₀) para o grupo exposto em bioensaios. Entretanto, a extensão dos danos, sobretudo no que concerne aos efeitos crônicos e em especial os mutagênicos e/ou

genotóxicos é pouco conhecida^{8,15,16}.

Em virtude da correlação estabelecida entre mutagenicidade e carcinogenicidade, segundo a qual substâncias reconhecidamente mutagênicas podem ser também carcinogênicas^{17,18,19} é relevante investigar o potencial mutagênico e/ou genotóxico de compostos organofosforados, como o temefós, em virtude dos riscos da periculosidade dos produtos aos quais os seres vivos estão expostos por períodos prolongados^{10,6}.

A análise genotóxica foi realizada através do teste de micronúcleo em células de medula óssea de camundongos (*Mus musculus*) *Swiss Webster* de ambos os sexos.

O teste de micronúcleo, desenvolvido por Von Ledeberg & Schmid²⁰ e Heddle et al.²¹ é utilizado para a detecção de agentes genotóxicos, com especial relevância para os programas de *screening* na vigilância à saúde,^{22,23,24} em ensaios *in vivo* ou *in vitro*, tendo sido apontado como um método para determinar a capacidade genotóxica (clastogênica) de uma substância e, conseqüentemente, seu potencial carcinogênico. O micronúcleo representa uma perda estrutural ou numérica de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, induzida por agentes genotóxicos (clastogênicos)^{21,24}.

Neste estudo foram investigados os efeitos genotóxicos (clastogênicos) nas células da medula óssea de camundongos de ambos os sexos, através da formação de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), expostos as diferentes doses de temefós 95,5% (grau técnico).

Mediante a escassez, na literatura, a respeito do potencial mutagênico e/ou genotóxico do temefós, o objetivo e a relevância desse estudo consistem em produzir conhecimentos sobre os efeitos mutagênicos em células de mamíferos, induzidos pela exposição ao inseticida organofosforado temefós.

Espera-se que os conhecimentos gerados deste estudo, contribuam aos serviços de Saúde, no sentido de re-avaliar as práticas dos programas oficiais de controle de vetores, assim como, os potenciais riscos destes produtos para a saúde humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Nos experimentos foram utilizados 180 camundongos (*Mus musculus*) albinos *Swiss Webster* de ambos os sexos, com 40 dias de vida e peso médio de 30 a 32g, fornecidos pelo biotério

Melo, MEB et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 67(3):196-201, 2008.

de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-Recife PE, onde foram mantidos em gaiolas apropriadas, aclimatados a temperatura de 20°C, com ciclos de iluminação (claro / escuro) a cada 12 horas. Foi oferecido diariamente ração balanceada e água filtrada, sem restrição nem interrupção. Antes da realização dos experimentos os animais passaram por um período de 8 dias em “quarentena” no biotério experimental, sob as mesmas condições ambientais e nutricionais que estavam no biotério de criação, até a hora do experimento.

Produtos químicos

Temefós, grau técnico 95,5% w/w (FERSOLR - 0259/05), inseticida organofosforado. A solução estoque foi preparada em etanol P.A. (32,14 mg/mL) e a solução de uso em água destilada estéril. A partir da DL₅₀ (444 mg/kg) foi determinada, através de testes prévios, a dose de 111 mg/kg como a dose máxima tolerada (DMT) por camundongos de ambos os sexos. Foram utilizadas nos experimentos as doses de 27,75; 55,5 e 111 mg/kg.

Ciclofosfamida (SIGMA®) fármaco antineoplásico citostático, universalmente empregado em testes para detecção de genotoxicidade, foi utilizada como padrão de controle positivo na dose de 25 mg/kg, em virtude dos resultados apresentados em experimentos preliminares. A solução de uso foi preparada em água destilada estéril a 1%.

Protocolo experimental

Os ensaios consistiram em administrar nos camundongos, via oral (gavagem), o temefós como substância teste. A Ciclofosfamida, via i.p., como padrão de controle positivo e água destilada estéril, via oral (gavagem), como controle negativo. Todos os animais receberam um volume total de 0,2 mL das respectivas soluções das substâncias.

Os camundongos foram divididos em 36 grupos formados por 05 animais / dose / sexo, para cada produto.

Os tratamentos foram administrados aos camundongos divididos em 6 grupos experimentais:

Grupo 1 – efeitos avaliados 24h após tratamento único. 1a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 27,75 mg/kg de peso corporal; 1b: 5 machos e 5 fêmeas receberam ciclofosfamida 25 mg/kg; 1c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 2: Efeitos avaliados 24h após tratamento único. 2a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 55,5 mg/kg de peso corporal; 2b: 5 machos e 5 fêmeas receberam ciclofosfamida 25 mg/kg; 2c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 3: Efeitos avaliados 24h após tratamento. 3a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 111,0 (DMT) mg/kg de peso corporal; 3b: 5 machos e 5 fêmeas receberam ciclofosfamida 25 mg/kg; 3c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 4: Efeitos avaliados 48h após tratamento. 4a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 111,0 (DMT)

mg/kg de peso corporal; 4b: 5 machos e 5 fêmeas receberam ciclofosfamida 25 mg/kg; 4c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 5: Efeitos avaliados 72h após tratamento. 5a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 111,0 (DMT) mg/kg de peso corporal; 5b: 5 machos e 5 fêmeas receberam ciclofosfamida 25 mg/kg; 5c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 6: Foram administradas 9 doses do produto-teste, uma por semana. Os efeitos foram avaliados 24h após administração da 9ª dose. 6a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 111,0 (DMT) mg/kg de peso corporal; 6b: 5 machos e 5 fêmeas receberam ciclofosfamida 25 mg/kg; 6c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Obtenção das células da medula óssea

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, os fêmures foram extirpados, dissecados, as epífises proximais foram cortadas para a extração da medula óssea. A medula foi extraída injetando-se 1,0 mL de soro fetal bovino no canal medular dos fêmures, colocando-se a suspensão de células dentro de um tubo de centrifuga contendo 2,0 mL de soro fetal bovino.

Teste de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos²⁴

A suspensão de células da medula óssea foi homogeneizada várias vezes com pipeta Pasteur fina e, em seguida, centrifugada a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos. Dos 3 mL da suspensão celular, descartou-se 2 mL do sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento e foram feitos os esfregaços (4 lâminas / animal), com 3 gotas da suspensão celular em lâminas limpas e secas, deslizando-se uma sobre a outra. Após secagem total das preparações citológicas, as lâminas foram colocadas em berço para coloração e fixadas em metanol P.A. durante 10 minutos.

As lâminas foram coradas 24 horas após a fixação do material, através de uma bateria de coloração, composta por 4 cubas onde as lâminas foram submersas em sequência: 1ª cuba com corante Leishman puro (3 minutos); 2ª cuba com solução Leishman em água destilada (1:6) durante 15 minutos, e em seguida lavadas várias vezes em água corrente; 3ª cuba contendo acetona P.A. (10 minutos). As preparações citológicas foram protegidas por lamínulas fixadas com bálsamo do Canadá / xilol (1:1).

Foram analisadas, em sistema duplo cego, 2.000 células / animal em microscópio óptico (10 x 100x), perfazendo um total de 10.000 células / grupo, sendo contabilizados os eritrócitos policromáticos (PCE) e os eritrócitos policromáticos micronucleados (PCE MN).

Análise estatística

Foi aplicado o teste do qui-quadrado de proporções do Soft Epi - Info - 6.04, ao nível de significância de 5%. Na escolha

Melo, MEB et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 67(3):196-201, 2008.

do teste levou-se em consideração o esquema experimental, e as transformações necessárias para que se fizessem comparações múltiplas dos resultados.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, registrado e licenciado sob o número L-0054/08 – Val. 30/06/2012.

RESULTADOS

Um dia após tratamento, foram detectados 1,63% de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) nos camundongos machos e 2,77% nas fêmeas do grupo controle positivo (CPA 25 mg/kg). Não foram observados PCEMN nos grupos controle negativo em nenhum dos momentos estudados nos experimentos (Figura 1).

Quanto aos animais tratados com temefós, nas doses 27,75, 55,5 e 111,0 mg/kg, e avaliados 24h após dose única, foram encontrados, respectivamente, 2,61%, 3,5% e 3,69% de PCEMN em machos, com percentuais crescentes para doses progressivamente maiores (Figura 1). Estes valores são significativamente maiores ($p = 0,0001$; $p < 1$) do que no controle positivo (CPA) ($p = 0,0177$; $p < 1$). Nos grupos de fêmeas, os percentuais de PCEMN (1,02%, 1,37% e 1,33% para doses crescentes de temefós) foram estatisticamente menores ($p = 0,1604$; $p < 1$) do que os observados no controle positivo ($p = 0,0177$; $p < 1$).

Nos grupos examinados 48h após tratamento, o mesmo percentual de PCEMN (0,05%) foi observado em camundongos machos e fêmeas que receberam CPA. Nos grupos tratados com temefós (111,0 mg/kg), os efeitos foram levemente mais acentuados em machos (0,18%) do que em fêmeas (0,11%). Entretanto estes valores não diferem estatisticamente ($p < 1$) dos observados no controle positivo (Figura 2). Após 72h do tratamento, os percentuais de PCEMN no grupo CPA foram os mesmos observados às 48h para ambos os sexos (0,05%) (Figura 3). Nos grupos tratados com temefós (111,0 mg/kg) os efeitos foram estatisticamente mais intensos, do que no controle positivo, apenas nos camundongos machos (0,92%, $p = 0,0001$).

A avaliação de grupos submetidos à exposição prolongada, feita 24 h depois do 9º tratamento, mostrou que o CPA (9 doses de 25 mg/kg) induziu 0,15% de PCEMN nos camundongos machos e 0,3% nas fêmeas (Figura 4). Os resultados observados nos grupos tratados com temefós (9 doses de 111,0 mg/kg) mostram, para os machos (0,53%) de PCEMN com valores significativamente maiores do que no controle positivo ($p = 0,0244$; $p < 1$) e 0,11% de PCEMN no grupo de fêmeas, estatisticamente menores do que o controle positivo ($p = 0,0205$; $p < 1$) com significância estatística entre machos e fêmeas (Figura 4).

Houve divergência de proporcionalidade entre camundongos machos e fêmeas, onde os camundongos machos apresentaram maior proporção. Com significância

estatística ao nível de 5% ($p < 0,0001$), tanto após as 72h da dose única, quanto após as 9 doses de 111,0 mg/kg.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que o organofosforado temefós produz alterações do material genético de camundongos, demonstradas pela formação de micronúcleo em eritrócitos policromáticos (PCE) da medula óssea de animais de ambos os sexos, expostos às doses de 27,75; 55,5 e 111,00 mg/kg (DMT) via oral e avaliados 24h após tratamento. A dose de 27,75 mg/kg é quatro vezes menor do que a DMT para a linhagem de camundongos utilizada neste estudo. Nos grupos de machos expostos ao temefós a relação dose-efeito foi clara, e os percentuais de PCE com micronúcleo (PCEMN) foram, nas 3 doses avaliadas, estatisticamente mais altos do que os observados com a ciclofosfamida (CPA), como controle positivo. Nos machos, a indução de PCEMN pelo temefós foi observada mesmo em PCE recolhidos da medula óssea até 72h após dose única de 111mg/kg. As fêmeas foram, por outro lado, menos susceptíveis à CPA e mais tolerantes ao temefós do que os machos. É muito freqüente, na literatura científica, constatações de diferenças entre sexo, quanto à resposta a agentes patogênicos, biológicos ou químicos, que podem ser atribuídos a aspectos comportamentais (diferentes graus de exposição aos agentes, por exemplo) ou biológicos, para os quais nem sempre há explicações convincentes. Os nossos resultados demonstram claramente uma maior tolerância das fêmeas ao temefós, mas os dados não indicam as prováveis causas deste fato. Nos grupos de fêmeas, a indução de PCEMN tanto pelo temefós quanto pela CPA foi constatada quando os PCE foram colhidos as 24 e 48h após administração de dose única. A avaliação dos efeitos 24h após a última aplicação de uma série de 9 doses administradas semanalmente, confirmou os efeitos do temefós em camundongos nos dois sexos, mas não houve aumento das taxas de PCEMN quando comparadas com as induzidas por dose única do organofosforado. A análise estatística mostrou diferença significativa ($p = 0,0001$) ao nível de 5%, entre dose única de 111mg/kg e as 9 doses (111 mg/kg), administradas semanalmente (Figuras 1 e 4).

Ficou evidente que o temefós possui efeito mutagênico em ambos os sexos, para as três concentrações testadas, permitindo ser detectado mesmo 72h após tratamento único.

Em nossos experimentos não foram detectados PCE micronucleados nos controles negativos (tratados com água), embora haja relatos na literatura científica de observação de taxa espontânea de PCE micronucleados, da ordem de 3/1000 células examinadas^{22,23}. O uso da CPA é recomendado nos protocolos de testes para detecção de genotoxicidade, como controle positivo, para assegurar a confiabilidade dos experimentos, realizados conforme os padrões estabelecidos.

Os resultados deste estudo corroboram conclusões, obtidas por outros autores, referentes à ação genotóxica

Melo, MEB et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 67(3):196-201, 2008.

(clastogênica), induzida pelo organofosforado temefós. Em estudos utilizando testes padronizados para mensurar mutagenicidade/genotoxicidade, Aiub et al⁸ concluíram que o temefós mostrou-se mutagênico: através do ensaio Cometa (SCGE), induzindo lesões grosseiras no DNA; no sistema SOS cromoteste para a linhagem PQ37 de *Escherichia coli* e através do teste de Ames com as linhagens de *Salmonella typhimurium*. Inclusive em testes com concentrações similares às utilizadas rotineiramente para combate ao *Aedes aegypti*^{3,2}. Pavão e Leão (2005)¹⁰ a partir de análise através de método químico-quântico

de caracterização de carcinogênicos, concluíram que o temefós, assim como outros inseticidas utilizados no combate ao *Ae. aegypti*, apresenta um forte caráter eletrofílico, uma das características de agentes químicos carcinogênicos.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que outros organofosforados, dentre eles, o malation, são um potentes agentes genotóxicos (clastogênicos), causando sérias alterações citogenéticas e provocando danos em células germinativas⁹, induzindo, além de aberrações cromossômicas, aumento na frequência de micronúcleos¹⁶.

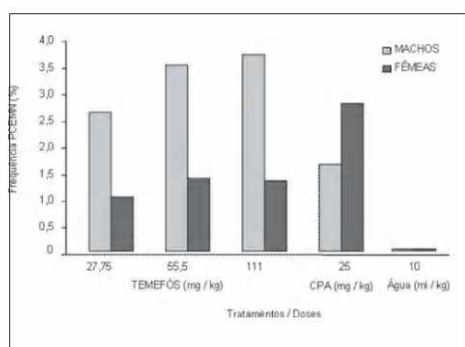


Figura 1. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) na medula óssea de camundongos machos e fêmeas tratados com temefós (grau técnico 95,5%), ciclofosfamida (CPA) como controle positivo (25 mg/kg), ou água destilada como controle negativo, em dose única. Os efeitos foram avaliados 24 horas após exposição via oral às substâncias.

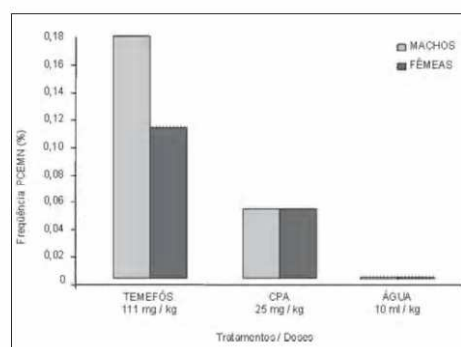


Figura 2. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) na medula óssea de camundongos machos e fêmeas tratados com temefós (grau técnico 95,5%) ou com ciclofosfamida (CPA) como controle positivo (25 mg/kg), ou com água destilada como controle negativo, em dose única. Os efeitos foram avaliados 48 horas após exposição via oral às substâncias.

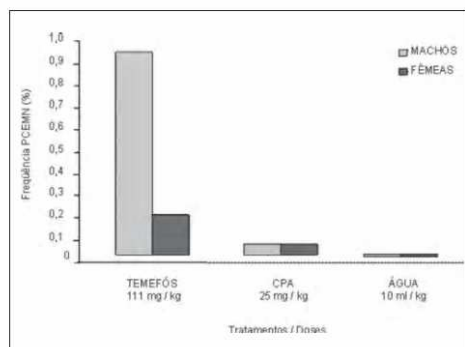


Figura 3. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), em células de medula óssea de camundongos machos e fêmeas, expostos ao Temefós (grau técnico 95,5%) ou a Ciclofosfamida (CPA) como controle positivo (25 mg / kg), e a água destilada, como controle negativo em dose única. Os efeitos foram avaliados 72 horas após exposição às substâncias.

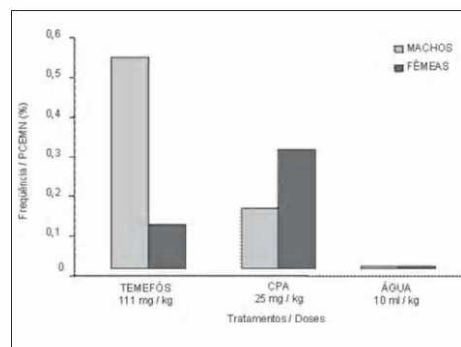


Figura 4. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), em células de medula óssea de camundongos machos e fêmeas, expostos ao Temefós (grau técnico 95,5%) ou a Ciclofosfamida (CPA) como controle positivo (25 mg / kg), e a água destilada, como controle negativo em dose única. Os efeitos foram avaliados 24 horas após 9 doses de 111mg/kg (1 dose / semana) de exposição às substâncias.

Melo, MEB et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 67(3):196-201, 2008.

Estes dados, entre outros disponíveis na literatura, alertam sobre o potencial risco para a saúde humana que representa o uso contínuo e rotineiro, durante mais de uma década de milhares de toneladas de produtos à base de temefós, em criadouros do vetor da dengue e que são, em sua grande maioria, recipientes com água armazenada para uso humano, impondo à população a ingestão e o contato dérmico com água contendo este organofosforado.

Frete aos potenciais riscos e danos que inseticidas organofosforados possam causar à saúde humana, bem como à fauna não alvo, pelo uso esporádico, sistemático e/ou constante, no âmbito doméstico, na agricultura ou em campanhas de Saúde Pública, enfatizamos ser imprescindível, como medida preventiva, considerar o potencial mutagênico e/ou genotóxico de produtos utilizados para o controle de insetos.

AGRADECIMENTOS

A Gilvan Mariano (designer gráfico)

REFERÊNCIAS

1. Forget G. Pesticides and the third world. *J Toxicol Environ Health* 1991;32:11-31.
2. Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol.* 2002;18(4):161-3.
3. Fundação Nacional de Saúde (BR). Coordenação Regional de Pernambuco. Relatório de situação das atividades de epidemiologia, sistema de informação e entomologia relacionadas ao PEAA, no estado de Pernambuco. Recife: A Fundação; 2001.
4. Secretaria Estadual de Saúde. Diretoria de Epidemiologia e Vigilância Sanitária. Dengue: - Relatório de Ações da Subcomissão de Epidemiologia. Recife: A Secretaria; 1987.
5. Secretaria Estadual de Saúde. Diretoria de Epidemiologia e Vigilância Sanitária. Estruturação do Plano de Erradicação de *Aedes Aegypti* no Brasil (PEAA), em Pernambuco. Recife: A secretaria; 1997.
6. Taylor P. Anticholinesterase agents. In: Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York: Editor; McGraw Hill; 1991.p.131-149.
7. World Health Organization. WHO Specifications and evaluations for public health pesticides: temephos [monografia na internet]. Genebra: A organização; 2007 [cited 2008 may 8]. Available from <http://www.who.int/whopes/quality/Temephos_eval_June_2007_corr_aug160807.pdf>
8. Aiub C A F, Coelho E C A, Sodré E, Pinto L F R, Felzenszwalb I. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet Mol Res.* 2002;1(2):159-166.
9. Giri S, Prasad S. B, Giri A, Sharma G D. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutat Res.* 2002;514:223-31.
10. Pavão A C, Leão M. Riscos de carcinogênese química no controle de *Aedes aegypti*. In: Augusto L G S, Carneiro M R, Martins P H. Abordagem ecossistêmica em saúde: Ensaios para o controle de dengue. Recife: Editora Universitária da UFPE. 2005 p. 213-225.
11. Cavaliere M J, Calore E E, Perez N M, Puga F R. Miotoxicidade por organofosforados. *Rev Saúde Pública.* 1996;30(3):267-72.
12. Eyer P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds: a review. *Hum Exp Toxicol.* 1995;14:857-864.
13. Koifman S, Koifman R J, Meyer A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad Saúde Publica.* 2002 18(2):435-445.
14. Repetto R, Baliga S. S. Review article: Pesticide and immunosuppression: the risks to public health. *Health Policy Plan.* 1997; 12(2):97-106.
15. Ashby J. Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. *Mutat Res.* 1988;204:543-551.
16. Degraeve N, Moutschen J. Genetic and cytogenetic effects induced in the mouse by as organophosphorus insecticide: malathion. *Environ Res.* 1984;34:170-4.
17. Cairns J. Somatic stem cells and kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:10567-10570.
18. Loeb L, Loeb K R, Anderson J P. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100:776-781.
19. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003;544:99-106.
20. Von Ledebur M, Schmid W. The micronucleus test. methodological aspects. *Mutat Res.* 1973;9:9-117.
21. Heddle J A, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Mac Gregor J T, Newell G T, Salamone M F. The induction micronuclei as measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental protection agency gene-tox program. *Mutat Res.* 1983;123:61-118.
22. Hayashi M, Mac Gregor J T, Gatehouse D G, Adler Ilse-Dore, Blakey D H, Dertinger S D. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II Some aspects of protocol design including repeated treatments integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):234-52.
23. Krishna G, Hayashi, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res.* 2000;455:155-166.
24. Schmid W. The Micronucleus test. *Mutat Res.* 1975;31:9-15.

CAPÍTULO V
ARTIGO SUBMETIDO
PARA PUBLICAÇÃO

5. - ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA

MUTAÇÃO E DANOS CROMOSSÔMICOS: REVISÃO*

MUTATION, DAMAGES CHROMOSOMIC: REVIEW*

Maria Eliane Bezerra de Melo MSc*¹, Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho PhD²

RESUMO

A mutação e a seleção natural constituem-se nos principais fatores do processo evolutivo na qual elimina as mutações deletérias, e preserva as combinações disponíveis que conferem maior adaptação ao ambiente. Surgindo, portanto novos genes e novas informações por mutação e/ ou recombinação. Do ponto de vista prático, o estudo dos genes tem permitido o diagnóstico molecular para um crescente número de patologias, o que é fundamental para evitar exames invasivos, casais em riscos, e prevenir o nascimento de novos afetados por doenças de início tardio. Danos cromossômicos são de grande relevância para os seres humanos, posto que um número significativo de doenças genéticas e processos cancerígenos é relatado como decorrente de anormalidades na estrutura ou no número de cromossomos. A pesquisa genotóxica na indústria química e farmacêutica é de suma importância como um instrumento de avaliação dos possíveis efeitos danosos, como o câncer, advindos da ação do composto químico sobre o organismo.

Palavras chave: mutação, danos cromossômicos, aberração cromossômica, genotóxico.

ABSTRACT

The mutation and natural selection are on the main factors in the evolutionary process in which eliminates the deleterious mutations, and preserves the combinations available that give greater adaptation to the environment. Therefore new genes and new information by changing and / or recombination. From the practical point of view, the study of genes has allowed the molecular

diagnosis for a growing number of diseases, which is essential to prevent invasive exams, couples at risk, and prevent the emergence of new diseases affected by the late start. Chromosomal damage are of great relevance for humans, since a significant number of genetic diseases and cancer cases is reported as caused by abnormalities in the structure or the number of chromosomes. The search genotoxicological in chemical and pharmaceutical industry is of paramount importance as a tool for evaluating the possible harmful effects such as cancer, arising from the action of the chemical compound on the body.

Words key: **mutation, damages chromosomic, chromosomic aberration, genotóxic.**

¹*Pesquisadora do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Laboratório de Mutagênese
Fundação Oswaldo Cruz – Recife PE. -- Av. Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE
CEP 50670-420

² Prof^a Dra. Centro de Ciências Biológicas / Depto. Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Av. Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE – CEP 50670-420

*Endereço para correspondência: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Fundação Oswaldo Cruz – Av. Moraes Rego, s/n – Campus / UFPE, Recife PE – CEP 50670-420

<e-mail: melomeb@cpqam.fiocruz.br>

INTRODUÇÃO

Mutações no DNA nuclear ou mitocondrial, de células somáticas, são relevantes em estudos de carcinogênese, assim como, em processos patológicos cardiovasculares, distúrbios metabólicos e neurológicos^{80,82}. As mutações somáticas são importantes não apenas na propensão do desenvolvimento do câncer, mas, sobretudo, no que diz respeito a sua origem monoclonal, com o surgimento de um tumor a partir de uma única célula inicialmente transformada. Com o envolvimento de mutações que incidem nos genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular^{20,60}.

As desordens genéticas levam muitas vezes à hipótese de que essas alterações sejam devidas a efeitos de agentes externos físicos ou químicos, considerando também outros fatores

como: ativação metabólica, processo de detoxificação de compostos químicos, vários sistemas de reparo, assim como o efeito do mutágeno na fisiologia celular^{18,54}.

Um outro ponto relacionado à origem das mutações no homem é o fator da faixa etária onde o aumento das mutações somáticas provenientes de falhas no mecanismo de reparo, está provavelmente relacionado à ação de radicais livres^{36,37,86,50,93}.

Além dos efeitos oncogênicos, somam-se os efeitos teratogênicos e os hereditários abrangendo os congênitos perceptíveis já ao nascimento, através da linhagem germinativa nas gerações seguintes, e aqueles decorrentes de mutações somáticas sutis, porém deletérias e irreversíveis, que se acumulam no reservatório genético humano^{34,71}.

Os agentes mutagênicos ambientais são de particular interesse, pois, a eles estamos constantemente expostos, como os poluentes que estão no ar, água, e alimentos, aumentando consideravelmente os riscos de indução de mutações e câncer no homem. Causando um aumento na taxa de mutação de todos os genes de uma célula^{1,10,11}.

A relevância desta revisão literária enfatiza a importância dos diferentes modelos *in vitro* ou *in vivo*, os quais são categorizados como indicadores biológicos que avaliam os diversos tipos de mutação: gênica ou pontual, cromossômica e genômica. Danos cromossômicos têm particular relevância para os seres humanos, posto que um número significativo de doenças genéticas seja relatado como decorrente de anormalidades na estrutura ou no número dos cromossomos^{77,78,79}.

REVISÃO LITERÁRIA

MUTAGÊNESE E DANOS CROMOSSÔMICOS

Toda mutação tem como origem um dano na estrutura do DNA ou um erro na sua replicação. Estes eventos podem ter origem endógena ou exógena. As mutações de origem endógena ou mutações espontâneas ocorrem por falhas do próprio metabolismo da célula como: erros na incorporação de bases que sofreram tautomerização, danos causados por hidrólise do DNA gerados pelo ambiente aquoso em que se encontram, e ação de radicais livres como aqueles formados por espécies ativas de oxigênio. As mutações espontâneas podem ser do tipo troca de

bases ou troca de referencial de leitura dependendo da lesão inicial sofrida pela célula. Outros danos freqüentemente associados com a geração de mutações espontâneas são a depurinização e a desaminação de bases criando sítios apurínicos²².

As mutações podem ser classificadas de diferentes maneiras dependendo do aspecto a ser enfocado. Nos organismos diplóides como os eucariotos, ou nos merodiplóides nos procariotos (uma cópia no DNA cromossomal e outra em um plasmídeo), as mutações podem ser classificadas como dominantes ou recessivas em função da expressão ou não do fenótipo alterado, respectivamente. Mutações podem ter natureza estrutural (incidem sobre um gene estrutural) ou reguladora, cuja expressão é detectada pela inabilidade em controlar outro gene^{22,29}.

Quanto ao tipo de alteração no DNA as mutações podem ser classificadas em três grupos gerais: (i) gênicas ou pontuais, (ii) cromossômicas, e (iii) genômicas. Sendo classificadas: em letais, quando os portadores não sobrevivem, ou ainda em somáticas ou germinativas⁸⁷.

As mutações pontuais são aquelas que envolvem alterações na seqüência de nucleotídeos em um ou mais de um códon e podem ocorrer pela substituição de bases, deleções ou adição de uma ou mais bases. As mutações por adição ou deleção de bases acarretam mudança do referencial de leitura na tradução, alterando a composição de aminoácidos de toda a proteína a partir do ponto onde ocorreu a mutação, sendo chamadas de mutações “frameshift” ou troca de referencial⁵⁹. Mutações pontuais, como troca de bases e mudanças de referencial, causam alterações relativamente pequenas no DNA e são detectáveis apenas pelos efeitos na expressão do gene alterado, não levando à mudanças no fenótipo correspondente⁴⁴.

Quando a mudança altera a atividade bioquímica da proteína, pode ocorrer uma mutação fenotípica como no caso da hemoglobina na anemia falciforme, e da insulina na diabetes. Em decorrência de o código genético ser degenerado (um mesmo aminoácido pode ser codificado por mais de um códon), nem todas as trocas de bases levam a modificações na seqüência dos aminoácidos não resultando, portanto, qualquer alteração fenotípica, são chamadas de mutações silenciosas^{62,94}.

As mutações tipo troca de base, que levam à modificação de um códon pela substituição de um aminoácido distinto daquele presente na proteína original, são chamadas de mutações de troca de sentido, enquanto que aquelas que geram um dos três códons de terminação,

interrompendo precocemente a tradução, são denominadas mutações sem sentido. As mutações de troca de base podem ainda ser divididas em transições (troca de uma purina por outra purina ou troca de uma pirimidina por outra pirimidina) ou transversões (troca de uma purina por pirimidina ou vice versa)⁸⁷.

Algumas mutações pontuais são condicionais, isto é, seus fenótipos só se expressam em determinadas condições como, por exemplo, em temperatura elevada. Temos ainda as mutações nutricionais que, em bactérias, geram os mutantes auxotróficos incapazes de sintetizar metabólitos essenciais (aminoácidos, vitaminas, bases nitrogenadas, etc). A reversão para a condição selvagem, isto é, a prototrofia, depende da ocorrência de nova mutação chamada de retromutação ou mutação reversa ou reversão, que restaura a base original ou incide em outros sítios, como os de síntese de RNA transferidor criando uma mutação supressora^{2,6}.

Mutações cromossômicas são reconhecidas pelas alterações grosseiras na estrutura dos cromossomos sendo usualmente detectadas pelo exame microscópico de células em metáfase e envolvem quebras, e eventualmente reunião, de material cromossômico durante o ciclo celular e incluem as inversões e translocações. As alterações encontradas são de dois tipos: cromossômicas e cromatídica, dependendo da fase do ciclo celular no qual ocorre a mutação. Se a mutação ocorrer nas fases G0, G1 e começo da fase S, a aberração será do tipo cromossômica. Caso ocorra no final da fase S, G2 e prófase, geralmente serão do tipo cromatídica. Podendo ser classificadas em diferentes tipos de aberrações (“gap”, “iso gap”, fragmento acêntrico simples, fragmento acêntrico duplo, quebra cromossômica, quebra cromatídica, anel, rearranjo cromossômico e células pulverizadas^{19,34,74,84}.

Os cromossomos deverão ser analisados e apresentados separadamente, calculando-se a frequência de aberrações por célula e para cada tipo de aberração^{24,79}. Estas mutações podem levar as grandes alterações na expressão gênica e em muitos casos podem ser letais^{32,33,53,71}.

As mutações genômicas são definidas como mudanças no número dos cromossomos de uma célula e aplica-se especificamente aos eucariotos. Estas mutações levam as alterações da condição euplóide, como as poliploidias, quando o genoma diplóide é duplicado ou triplicado, ou as aneuploidias, que ocorrem pela não disjunção de cromossomos específicos durante a divisão celular (por exemplo, trissomias e monossomias)^{56,74}.

O estudo dos genes tem permitido o diagnóstico molecular para um número crescente de patologias, discute-se, portanto, quais as perspectivas em relação ao tratamento destas patologias

genéticas incluindo a clonagem para fins terapêuticos. Do ponto de vista prático, o estudo dos genes tem permitido o diagnóstico molecular para um crescente número de patologias, o que é fundamental, por exemplo, para evitar exames invasivos de casais em riscos, e prevenir o nascimento de novos afetados por doenças de início tardio, para as quais ainda não existe tratamento. Entender como os genes funcionam, e como ocorre a mutação gênica, é o primeiro passo para o tratamento de diversas doenças genéticas^{42,43,76}.

RELAÇÃO MUTAÇÃO-CÂNCER

A evidência molecular de que lesões no DNA causam câncer surgiu a partir de pacientes com a doença *Xeroderma pigmentosum* (XP). Esta doença genética autossômica recessiva se caracteriza por uma sensibilidade acentuada à radiação ultravioleta. Tais indivíduos quando expostos aos raios solares apresentam uma alta frequência de neoplasias malignas, como o câncer de pele. As células de pacientes com XP são deficientes no sistema de reparo por excisão, não sendo capazes de retirar dímeros de pirimidina. O acúmulo de danos leva a um aumento na incidência de mutações somáticas pontuais, em geral transições do tipo G:C por A:T, que acabam por resultar em transformações malignas^{55,90,97}.

É cada vez mais demonstrado que o câncer é consequência da interação química com o material genético, o qual tem um papel significativo na interação com os demais fatores determinantes da doença. No caso dos cancerígenos, sabe-se que o reparo celular é duvidoso e depende de muitos mecanismos, que ainda estão sendo elucidados^{14, 15,16}.

A comprovação científica da origem mutacional de vários tipos de câncer oriundos do efeito de compostos químicos, e o aumento do risco de exposição a poluentes ambientais e substâncias tóxicas, levaram à necessidade de se desenvolver testes que permitem investigar o potencial mutagênico de substâncias diversas^{2,5,6,7}.

Quebra na molécula do DNA parece também ser uma causa importante para o início do processo cancerígeno^{17,18}. Certos tipos de tumores são formados por células com determinadas anomalias cromossômicas e podem ser herdadas em alguns casos como, por exemplo, o retinoblastoma e o neuroblastoma. Estes casos demonstram que o câncer também tem um componente genético hereditário importante e resulta, portanto, de pelo menos duas mudanças

genéticas, uma transmitida pelos gametas, nos casos hereditários, e outra adquirida via mutações somáticas^{23,28}.

Um grupo de genes com estrutura conservada em diferentes espécies de vertebrados foi denominado de proto-oncogenes já que seus componentes são capazes de controlar a proliferação e diferenciação celular. Genes semelhantes também são encontrados em retrovírus e levam à rápida transformação maligna de células infectadas. A ativação destes proto-oncogenes ou a inativação de genes supressores, por diferentes mecanismos como mutações pontuais, inversões, e outros rearranjos cromossômicos, podem levar à formação de tumores^{76,82}. A demonstração de que a ativação de um oncogene sobre uma única célula é suficiente para o posterior desenvolvimento de um tumor provou definitivamente a origem monoclonal do câncer, baseada no acúmulo de mutações somáticas^{20,60,63}.

Mutações no DNA nuclear ou mitocondrial, de células somáticas, são de relevância não somente em estudos de carcinogênese, como também em processos patológicos cardiovasculares, distúrbios metabólicos e neurológicos. As mutações somáticas são importantes não apenas na propensão do desenvolvimento do câncer, mas, sobretudo, no que diz respeito a sua origem monoclonal, com o surgimento de um tumor a partir de uma única célula inicialmente transformada. O primeiro passo seria o envolvimento de mutações que incidem nos genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular^{35,82}.

Além dos efeitos oncogênicos, somam-se os efeitos teratogênicos e os hereditários abrangendo os congênitos perceptíveis já ao nascimento, através da linhagem germinativa nas gerações seguintes, e aqueles decorrentes de mutações somáticas sutis, porém deletérias e irreversíveis, que se acumulam no reservatório genético humano⁸⁷.

A carcinogenicidade e a mutagenicidade apresentam muitos aspectos em comum. Compostos carcinogênicos são reconhecidamente mutagênicos, como as substâncias presentes no fumo, os raios-x, a radiação ultravioleta, arbestos e outros. Compostos químicos reconhecidamente cancerígenos são em sua maioria positivos, quando testados em ensaios que medem a mutagenicidade, como o teste de Ames, enquanto que, drogas reconhecidamente não cancerígenas, em geral não são mutagênicas^{1,3,8,9}.

Na grande maioria os agentes químicos que induzem câncer são mutagênicos e/ou genotóxicos⁴. Quebras na molécula do DNA parecem ser a principal causa do processo

cancerígeno^{20,21,60}. Há propensão genética ao câncer, em função da herdabilidade de mecanismos celulares de reparação deficientes; da herdabilidade de certos tipos de câncer, reconhecíveis por aberrações cromossômicas; e dos genes oncogênicos, os quais são capazes de gerar um tumor a partir de uma única célula^{17,76}.

A proliferação celular descontrolada também é um fator comum a todos os processos cancerígenos. Inicialmente pensou-se que o mecanismo molecular pelo qual ocorria a descontrolada proliferação celular fosse proveniente de produtos gênicos e do modo como eles se relacionavam com o crescimento celular. Verificou-se depois que o produto gênico de vários oncogene é uma enzima - a cinase protéica, que fosforila aminoácidos aumentando pelo menos dez vezes o processo de fosforilação em uma célula cancerígena. Com a descoberta dos oncogene através dos retrovírus, verificou-se que quando um vírus portador de um oncogene invade uma célula, o padrão de crescimento desta célula torna-se descontrolado, originando diferenciação celular em células neoplásicas²⁰.

MECANISMOS DE REPARO DO DNA

Um grande número de evidências, além da existência de doenças como o XP, indicam que o primeiro passo para a geração do câncer envolve mutações em células somáticas, muitas vezes geradas por falhas na ação de mecanismos de reparo^{15,16,81}.

A molécula de DNA é constantemente agredida por mutações, quer sejam oriunda de fatores físicos e químicos, incluindo produtos do próprio metabolismo celular e, biológicos, como os vírus e bactérias e, portanto existem os mecanismos de reparo que removem essas lesões ou auxiliam a célula a tolerá-las^{14,15}. Estes mecanismos constituem sistemas de defesa extremamente eficientes que garantem a estabilidade do genoma e conseqüentemente a própria existência da célula e/ou do organismo^{16,69,80}.

Uma célula poderá responder de vários modos após sofrer uma lesão no DNA: i) não restaurar os danos e morrer; ii) reparar precisamente a seqüência original de bases nitrogenadas e sobreviver sem maiores alterações no genoma; iii) restaurar os danos, mas alterar a seqüência original de bases gerando com isto mutações que serão fixadas durante a replicação e serão herdadas pelas células filhas após a divisão celular. Logo, a presença de sistemas de reparo do

DNA, embora essencial para a sobrevivência da célula, pode ser responsável pela geração e fixação de mutações no genoma. Vários mecanismos de reparo de DNA são conhecidos e auxiliam a célula a remover ou evitar danos no DNA^{14,16}.

Os sistemas de reparo livres de erro restauram o dano, sem alterar a sequência de bases do DNA como, por exemplo, a fotoreativação na qual enzimas específicas rompem as cadeias criadas entre dímeros de pirimidina após irradiação com radiação ultravioleta³⁰. Outro sistema de reparo livre de erro é aquele dependente de metiltransferases que removem grupos alquil adicionados à guanina para uma proteína aceptora restaurando o pareamento normal do DNA¹⁵. O reparo de bases com pareamento errôneo (“mismatch repair”) atua removendo bases tautoméricas incorporadas em posições incorretas. Este sistema envolve a ação de diversas proteínas que operam após a replicação removendo as bases não pareadas e restaurando a sequência original. O sistema de reparo por excisão, também considerado um mecanismo de reparo livre de erro, reconhece e remove bases danificadas e lesões no DNA. Estes sítios são reconhecidos por endonucleases que removem os oligonucleotídeos adjacentes ao dano, clivando precisamente a cadeia do DNA, gerando uma falha posteriormente restaurada pela ação em conserto de polimerases e ligase⁸⁰.

O reparo SOS sujeito a erro é uma das principais fontes de mutação induzida na célula. Esta atividade é acompanhada em vários testes para a determinação da mutagenicidade induzida em microrganismos⁹⁶. Age como um sistema multigênico de reparação celular sujeito a erro, foi primeiramente proposto por Defais *et. al* em 1971³⁰ para explicar um conjunto de fenômenos que ocorriam em *Escherichia coli* após lesão no DNA sob o controle coordenado de dois genes *rec A* e *lex A*. No estado normal da célula o sistema SOS está inibido. Todos os genes que fazem parte do sistema encontram-se bloqueados pelo repressor *lex A*, mas o nível de expressão basal de alguns deles é suficiente para manter as funções celulares essenciais como a recombinação por homologia mediada pela proteína Rec A. Quando a célula tem seu DNA danificado, ou sua replicação comprometida, gera-se um sinal que ativa reversivelmente a proteína Rec A, esta irá induzir a autoclivagem do repressor Lex A e, conseqüentemente, a ativação dos genes por ele regulados⁶¹. À medida que estes genes tornam-se derreprimidos, funções específicas são expressas, como aumento na capacidade de reparação do DNA, inibição da atividade respiratória e bloqueio da divisão celular⁹⁶. Além destes fenótipos é possível observar um aumento considerável na taxa de mutação durante a ativação do sistema SOS. Esta elevação é devida à

presença dos produtos dos genes UmuDC que conferem às polimerases celulares capacidade de proceder com a replicação mesmo quando fitas danificadas são utilizadas como molde. Como resultado desta atividade replicativa alterada, várias bases não homólogas são inseridas na fita recém sintetizada, gerando mutações que são fixadas após um novo ciclo de replicação e divisão celular^{87,94}.

MONITORAMENTO BIOLOGICO PARA DETECÇÃO DE DANOS CROMOSSÔMICOS

Ensaio para aferição da mutagenicidade demonstraram haver inter-relação entre mutagenicidade e carcinogenicidade¹². Através de um estudo da mutagenicidade de 300 compostos com atividade carcinogênica conhecida, foi detectado pelo ensaio *Salmonella*/fração microsomal de fígado de rato, que cerca de 90% dos compostos testados com ação cancerígena, apresentaram também ação mutagênica, quando submetidos ao teste de Ames^{3,5,11,66}. Proporção semelhante foi encontrada entre os compostos desprovidos de atividade cancerígena, que se revelaram negativos para atividade mutagênica^{1,66}. Estes resultados foram posteriormente validados por diferentes autores empregando abordagens diversas para a medição da mutagenicidade^{46,67,68,73}.

As técnicas de análise molecular, que revelam as alterações no DNA e alterações na expressão gênica, estão sendo cada vez mais utilizadas na tentativa de constituírem marcadores biológicos para estudos epidemiológicos e ações de prevenção^{24,42,75}. Atualmente está definido que as técnicas moleculares aplicadas ao DNA e à proteína “adduct” (macromolécula modificada, produzida quando um agente químico, ou seus metabólitos, ligam-se covalentemente com ácidos nucleares), podem ser úteis na definição dos níveis críticos da ação de compostos químicos, ao passo que as análises citogenéticas revelam o efeito genotóxico (clastogênico) causado pelas exposições a agentes químicos, suspeitos de efeito carcinogênico e genotóxico^{21,77,78,79,82}.

A administração de agentes químicos a serem avaliados em animais de laboratório, em geral roedores, tem sido o método considerado mais preciso para a aferição da mutagenicidade, particularmente a carcinogenicidade^{65,71,72}.

Ensaio citogenéticos podem ser usados para monitorar populações expostas a um grande número de clastogênicos ocupacionais e ambientais^{10,13,25,32}. As células da medula óssea têm se revelado mais sensíveis para evidenciar o efeito genotóxico (clastogênico), no entanto, este tipo de teste, na prática, consome muito tempo e requer observadores especializados.

A detecção dos danos cromossômicos, como parâmetros citogenéticos, que podem ser estudados, incluem as aberrações cromossômicas, a troca de cromátides irmãs e os micronúcleos^{74,85,91,92}. É de suma importância que estes ensaios façam parte de baterias de testes usados em avaliações de quaisquer agentes indutores de mutagenicidade^{48,71,83,84}. Os testes propostos têm como objetivo a análise citogenética de cromossomos de células da medula óssea ou de linfócitos de sangue periférico, os quais já estão bem estabelecidos do ponto de vista metodológico^{49,70,85,98}.

MONITORAMENTO EMPREGANDO MICRORGANISMOS: TESTE DE AMES.

Entre os testes rápidos feitos com bactérias destacam-se o teste de Ames ou mutatest, utilizado mundialmente pela sua eficiência em detectar a ação mutagênica de compostos químicos e/ou biológicos. O teste tornou-se válido a partir de estudos que mostraram correlação entre a mutagenicidade, medida neste ensaio, e a carcinogenicidade em mamíferos^{2,5,6,9,66}.

O teste de Ames baseia-se na indução de mutações que reverterem à condição de prototrofia em mutantes auxotróficos para biossíntese da histidina em *Salmonella typhimurium*. São utilizadas quatro linhagens de *S. typhimurium*, (TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102) portadoras de diferentes mutações no óperon da histidina tornando-as incapazes de sintetizar este aminoácido^{8,9,48}. As linhagens também apresentam outras mutações que aumentam a sensibilidade para a detecção de agentes mutagênicos: a mutação *rfa* provoca a perda parcial da camada lipopolissacarídica da superfície bacteriana permitindo a passagem de moléculas maiores, como o benzo(a)pireno, através do envoltório bacteriano; a mutação *uvrB*, inativa o mecanismo de reparo livre de erro por excisão^{64,80}. Esta mutação, na verdade uma deleção no cromossomo bacteriano, se estende ao gene *bio*, necessário para a síntese de biotina. Além disto, estas linhagens carregam o plasmídeo pkm 101, que codifica para resistência à ampicilina e

aumenta a sensibilidade a agentes mutagênicos pela expressão aumentada dos produtos dos genes *mucAB*, homólogos aos *umuDC* cromossomais^{46,67}. A linhagem TA 102 contém ainda a mutação no gene *hisG428* e o gene para a resistência à tetraciclina em um plasmídio multicópia (pAQ1), além do plasmídio pKM 101. Esta linhagem não contém a mutação *uvrB* por ter sido construída para detectar drogas que necessitam de um sistema de reparo por excisão íntegro, como os agentes oxidantes. Cada linhagem apresenta sensibilidade maior para substâncias que induzam mutações reversas específicas no gene *his* mutado⁵⁸. Desta forma, a linhagem TA 100 detecta preferencialmente agentes mutagênicos que promovem troca de bases, enquanto que a linhagem TA 98, com a mutação de troca de referencial de leitura no gene *hisD*, detecta preferencialmente mutações induzidas do tipo troca de referencial de leitura. Especificidade semelhante é compartilhada pela linhagem TA97 que tem uma citosina a mais no gene *hisD*^{59,64}.

Um aprimoramento importante no teste de Ames foi à incorporação de frações microssomais de fígado de rato para a medição dos efeitos mutagênicos de drogas que precisam de ativação metabólica. A adaptação consiste em adicionar frações, enriquecidas com enzimas de retículo endoplasmático (fração S9) de hepatócitos de ratos e cofatores enzimáticos (mistura S9), às linhagens bacterianas utilizadas no teste. A partir daí, o teste também foi denominada de Salmonella / fração microssomal de fígado de rato⁶.

Uma adaptação do ensaio capaz de reduzir drasticamente os custos do teste foi proposta por Nestmann e colaboradores (1987)⁷³, que desenvolveram um teste denominado de Simulteste. Nesta variação as linhagens são testadas em conjunto e não isoladamente, como no protocolo original do teste de Ames.

MONITORAMENTO EMPREGANDO ENSAIOS CITOGENÉTICOS

Os testes citogenéticos com roedores são os que mais se aproximam de um ideal no que se refere à avaliação da mutagenicidade de agentes genotóxicos e sua extrapolação para o homem. A proximidade filogenética, a natureza das células, a presença de processos fisiológicos normais do animal atuando na absorção, distribuição, ativação e excreção da droga fazem destes testes os paradigmas dos ensaios toxicológicos e genotóxicos^{65,78}. Os testes citogenéticos, de metáfases e de micronúcleos, também podem ser feitos *in vitro* com células de mamíferos, com os linfócitos

de sangue periférico. No entanto, estes testes têm como grande restrição à ausência de processos metabólicos que ocorrem apenas *in vivo*^{70,71}.

A detecção dos danos cromossômicos, através de ensaios citogenéticos, *in vivo e in vitro*, tem particular relevância para os seres humanos, posto que, um número significativo de doenças genéticas é relatado como decorrente de anormalidades na estrutura ou no número dos cromossomos. A análise citogenética de cromossomos já está bem estabelecida do ponto de vista metodológico, assim como, tem revelado ser mais sensível para evidenciar o efeito genotóxico (clastogênico)^{49,72,83,98}

O exame microscópico dos cromossomos para a detecção de aberrações estruturais, alterações numéricas e troca de cromátides irmãs é o procedimento melhor estabelecido para a avaliação dos efeitos genotóxicos de drogas sobre as células de mamíferos^{77,78,79}.

Anomalias cromossômicas ocorrem em baixa frequência em indivíduos não expostos a agentes genotóxicos. Entretanto, na presença destes compostos observa-se um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas na forma de micronúcleos^{88,89}. As principais lesões cromossômicas acompanhadas em testes citogenéticos são falhas, isto é, regiões de baixa densidade nos cromossomos, quebras, trocas cromatídicas, pulverização de cromossomos e poliploidias^{77,79}.

Outro ensaio citogenético utilizado no monitoramento de agentes genotóxicos é a determinação da frequência de micronúcleos em células de medula óssea de roedores. O teste de micronúcleo é um teste rápido, o qual é mundialmente utilizado para a detecção de agentes genotóxicos^{40,41,95}. Devido a sua relativa simplicidade e especificidade, este teste é frequentemente utilizado em investigações de clastogenicidade^{39,45}. O procedimento técnico e a utilização do teste foram padronizados pelo “Collaborative Study Group” (1986, 1992)^{26,27}. Micronúcleos representam uma perda estrutural ou numérica resultante de fragmentos cromossômicos, ou cromossomos inteiros, induzidos por agentes genotóxicos que danificam diretamente os cromossomos produzindo quebras ou afetando o aparato do fuso acromático. Os fragmentos que não se orientam para os núcleos das células filhas ficam soltos no citoplasma dando origem aos micronúcleos e podem ocorrer em qualquer tipo de célula em rápida proliferação³⁸. Eles são mais facilmente reconhecíveis em células onde o núcleo principal está ausente, como nos eritrócitos jovens ou eritrócitos policromáticos (EPC). Estas células da medula óssea passam por seis a sete divisões que levam cerca de 10 horas. Após 10 horas da

última divisão mitótica ocorre a expulsão do núcleo permanecendo os EPC na medula por mais 10 horas. Os EPCs são considerados as células alvo para pesquisa de micronúcleos^{40,41,42}. Entretanto, eritrócitos maduros, os eritrócitos normocromáticos (ENC) do sangue periférico também podem ser analisados, já que eritrócitos micronucleados não são removidos pelo baço^{51,52}. Um aumento na frequência de micronúcleos induzidos por um agente químico pode também estar associado a irregularidades no desenvolvimento celular durante a eritropoiese, provavelmente pela aceleração do metabolismo da medula óssea. Este mecanismo foi demonstrado por experimentos realizados em pacientes anêmicos usando eritropoetina na terapêutica^{88,89}.

Micronúcleos também podem ser formados por cromossomos não segregados no final da mitose devido à ação de drogas que interferem na formação do fuso acromático⁸⁵. Os micronúcleos foram classificados quanto ao seu tamanho e concluiu que aqueles provenientes do tratamento com um agente que interfere no aparato do fuso mitótico, geralmente possuem um diâmetro maior do que aqueles induzidos por um agente químico com ação clastogênica. Os resultantes de fragmentos cromossômicos são em geral menores do que aqueles resultantes de cromossomos inteiros^{45,47}. Com a descoberta de anti-corpos anti-cinetócoros em soro de pacientes com escleroderma foi possível analisar por imunofluorescência a natureza dos micronúcleos, isto é, aqueles provenientes de cromossomos inteiros (com cinetócoro) ou de fragmentos cromossômicos (sem cinetócoro). Foi demonstrado que 90% dos micronúcleos originados pela ação da colcemide eram originados de cromossomos inteiros, pois reagiam positivamente com o anticorpo (Henning *et al* 1988). Por outro lado, 85% dos micronúcleos de pacientes com ataxia telangiectasia e 91% dos micronúcleos dos pacientes induzidos por raios-x são cinetócoro negativo³¹.

Testes citogenéticos também podem ser feitos *in vitro* com células de mamíferos em cultura, como por exemplo, a cultura de linfócitos de sangue periférico humano⁷⁰. De forma semelhante aos testes citogenéticos *in vivo*, as principais lesões acompanhadas em células mantidas em cultura expostas a agentes clastogênicos são as aberrações cromossômicas que podem ser falhas, lesões acromáticas e quebra de cromátides resultando em perda do material cromossômico ou formação de configurações complexas^{71,74,78,79}. Podem ser investigadas também as alterações no número de cromossomos e a troca entre cromátides irmãs (TCI)^{57,72}. Muito embora a TCI seja um processo normal de células em divisão nos tecidos dos mamíferos,

sua incidência aumentada é considerada um indicador sensível de genotoxicidade de agentes químicos^{71,74,91}.

CONCLUSÕES

A investigação do potencial mutagênico e/ou genotóxico de substâncias químicas é de grande aplicabilidade na indústria química e farmacêutica, permeando, portanto, a utilização destas ferramentas como um instrumento de avaliação dos possíveis efeitos danosos, como o câncer, advindos da ação do composto químico sobre o organismo.

Danos cromossômicos têm particular relevância para os seres humanos, posto que um número significativo de doenças genéticas e processos cancerígenos é relatado como decorrente de anormalidades na estrutura ou no número de cromossomos.

REFERÊNCIAS

1. Ames, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer. Science, Washington, v.304, p.587-593, 1979.
2. Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.70, p.2281-2285, 1973a.
3. Ames, B. N., Gold, L. S. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. Environmental and Molecular Mutagenesis, Washington, v.14, p.66-77, 1989.
4. Ames, B. N., Gold, L. S. Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. Mutation. Research, Amsterdam, v.447, p.3-13, 2000.
5. Ames, B. N., Gold, L. S. Response to letter: paleolithic diet evolution and carcinogens. Science, Washington, v.238, p.1634-1641, 1987.

6. Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E., An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings National Academy Sciences of the United States of America*, Washington, v.70, p.782-786, 1973 b.
7. Ames, B. N., Mccann, J. Validation of the Salmonella test: a reply to Rinkus and Legator. *Cancer Research*, Baltimore, v.41, p.4192-4196, 1981.
8. Ames, B. N., Mccann, J.; Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens with the Salmonella /mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, Amsterdam, v.31, p.347-364, 1975.
9. Ames, B. N., The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: A. HOLLAENDER (Ed) *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York, Plenum, 1971. p.267-282.
10. Ames, B. N., The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: A. ANWAR, W. A. *Biomarkers of human exposure to pesticides. Environmental Health Perspectives*, Research Triangle Park, v.105, Suppl. 4, p.801-806, 1997.
11. Ames, B. N., The detection of environmental mutagens and potential carcinogens. *Cancer Research Foundation*, Baltimore, v.15, p.2034-2040, 1984.
12. Ashby, J. - Comparison of techines for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. *Mutation. Research*, Amsterdam, v.204, p.543-51, 1988.
13. Augusto, L.G.S; Lieber, S. R., Ruiz, M. A., Souza, C. A. Micronucleus Monitoring to Assess Human Occupational Exposure to Organochlorides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, New York, v.29, p. 46-52, 1997.
14. Balajee, A. S.; Bohr, V. A. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene*, Amsterdam, v.250, p.15-30, 2000.

15. Batty, D. P.; Wood, R. D. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*, Amsterdam, v.241, p.193-204, 2000.
16. Bernstein, C.; Bernstein, H.; Payne, C. M.; Garewal, H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation. Research*, Amsterdam, v.511, p.147-178, 2002.
17. Bishop, J. M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, Cambridge, v.64, p.235-248, 1991.
18. Boein, J. J. W. A.; Vermeulen, A. T.; Mullenders, L. H. F; Natarajan, A. T. The impact of radiation quality on the spectrum of X-ray induced exchange aberrations. *International Journal of Radiation Biology*, London v.77, p-847-857, 2001.
19. Boein, J. J. W. A.; Vermeulen, J. M.; Mullenders, L. H. F.; Natarajan, A. T. Intra-changes as a part of complex chromosome-type exchange aberrations. *Mutation. Research*, Amsterdam. v.504, p-3-16, 2002.
20. Brusick, D. J. Structure-activity relationships in mutation and cancer. *Mutation Research*, Amsterdam, v.305, p.1, 1994.
21. Brusick, D. J., Ashby, J., De Serres, F. J., Lohman, P. H. M., Matsushima, T., Mater, B. E., Mendelsohn, M. L., Moore II, D. H., Nesnow, S., Waters, M. D. A method for combining and comparing short-term genotoxicity test data: Preface. A Report from ICPENC Committee 1. *Mutation Research*, Amsterdam, v.266, p.1-6, 1992.
22. Burns, G. W., Bottino, P. J. Mutação gênica. In: _ Genética. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap.13, p.207-225.
23. Cairns, J. Somatic stem cells and kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, p.10567-10570, 2002.

24. Carano, A. V., Natarajan, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research*, Amsterdam, v.204, p.379-406, 1988.(ICPEMC Publication, 14).
25. Cavaliere, M. J., Calore, E. E., Perez, N. M., Puga, F. R. Miotoxicidade por organofosforados. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 30 (3), p. 267-72, 1996.
26. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS. *MMS. Mutation Research*, Amsterdam, v.278, p.83-98, 1992.
27. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT). Sex difference in the micronucleus test. *Mutation Research*, Amsterdam, v.172, p.151-163, 1986.
28. Cotton, R. G. H. Current methods of mutation detection. *Mutation Research*, Amsterdam, v.285, p.125-144, 1993.
29. De Flora, S. First Annual Meeting of the Italian Section of the European Environmental Mutagen Society (SIMA). *Mutation Research*, Amsterdam, v.291, p.217-222, 1993.
30. Defais, M., Fauquet, P., Radman, M. Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of lambda in different genetic systems. *Virology*, New York, v.43, p.495-503, 1971.
31. Degrassi, F., Tanzarella, C. Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutation Research*, Amsterdam, v.203, p.339-345, 1988.
32. Environmental Health Criteria -46. Guidelines for the study of genetic effects human population. *Gêneva World Health Organization*, 1985. 26p.

33. Environmental Protection Agency-Epa (EUA) - Guidelines for mutagenicity risk assessment, Washington, 1986 [Fed. Reg 51: 34006-34012].
34. Evans, H. J. Mutation cytogenetics: past, present and future. *Mutation Research*, Amsterdam, v.204, p.355-364, 1988.
35. Fearon, E. R., Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, Cambridge, v.61, p.759-767, 1990.
36. Gutteridge, J. M. C. Ageing and free radicals. *Medical Laboratory Sciences*, London, v.49, p.313-318, 1992.
37. Harman, D. Free radical theory of ageing. *Mutation Research*, Amsterdam, v.275, p.257-266, 1992.
38. Hart, J.W., Hartley-Asp, B. Induction of micronuclei in the mouse revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutation Research*, Amsterdam, v.120, p.127-132, 1983.
39. Hayashi, Makoto, Tice, Raymond. R., Macgregor, James. T., Anderson, Diana, Blakey, David. H., Volders, M. Kirsh., Oleson Jr, Frederick. B., Pacchierotti, Francesca, Romagna, Felix, Shimada, Hiroyasu, Sutou, Sizuyo, Vannier, Bernard. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, Amsterdam, v.312, p.293-304, 1994.
40. Heddle, L. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research*, Amsterdam, v.18, p.187-190, 1973.
41. Heddle, L. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourin, K., Mac-Gregor, J. T., Newell, G. W., Salamone, M. F. The induction micronuclei as measure of genotoxicity. A report of the U.S. Enviromental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, Amsterdam, v.123, p.61-118, 1983.

42. Hemminki, K. - Use of chemical, biochemical, and genetic markers in cancer epidemiology and risk assessment. *American Journal of Industrial Medicine*, New York, v. 21, p. 65-76, 1992.
43. Henning, V. G. G., Rudd, N. L., Hoar, D. I., Kinetochore immunofluorescence in micronuclei: a rapid method for the *in situ* detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblasts. *Mutation Research*, Amsterdam, v.203, n.6, p.405-414, 1988.
44. Henriques, J. A. P., Querol, C. B. Base molecular da mutação. In: COSTA, S. O. P. *Genética molecular e de microorganismos - Fundamentos da engenharia genética*. São Paulo, Editora Manole, 1987. cap.8, p.117-136.
45. Hirai, O., Miyamae, Y., Fujino, Y., Izumi, H., Miyamoto, A., Onoguchi, H. Prior bleeding enhances the sensitivity of the *in vivo* micronucleus test. *Mutation Research*, Amsterdam, v.264, p.109-114, 1991.
46. Hofnung, M., Quillardet, P. Recent developments in bacterial short-term tests for detection of genotoxic agents. *Mutagenesis*, Oxford, v.1, p.319-330, 1986.
47. Hogstedt, B., Karlsson, A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Research*, Amsterdam, v.156, p.229-232, 1985.
48. Hollstein, M., Mccann, J. Short term test for carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, Amsterdam, v.65, p.133-226, 1979.
49. Hsu, T. C., Patton, J. L. Bone marrow preparations for chromosome studies. In: Bernischke, K. (ed.) *Comparative Mammalian Cytogenetics*, New York, 1969, p. 454-460.
50. King, C. M., Gillespie, E. S., McKenna, P. G., Barnett, Y. A. An investigation of mutation as a function of age in humans. *Mutation Research*, Amsterdam, v.316, p.79-90, 1994.

51. Kirkland, D. Chromosome aberration testing genetic toxicology-past, present and future. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 404, n.1-2, p.173-185, 1998.
52. Kirkland, D. J., Galloway, S. M., Sofuni, T. Summary of major conclusions. *Mutation Research*, Amsterdam, v.312, p.205-209, 1994.
53. Kirsch-Volders, M.; Vanhauwaert, A.; De Boeck, M.; Decordier, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research*, Amsterdam, v.504, p-137-148, 2002.
54. Klaassen, C. D., Watkins Iii, J. B. Casarett & Doull's Toxicology. In: *Companion Handbook. The Basic Science of Poisons*, New York, 1999, cap. 8, 9, 10.
55. Kraemer, K. H., Lee, M. M., Scotto, J. Xeroderma pigmentosum: cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Archives of Dermatology*, Chicago, v.123, p.241-250, 1987.
56. Lander, E. S.; Weiberg, R. A. Genomics: journey to the center of biology. *Science*, Washington, v.287, p-1777-1782, 2000.
57. Latt, S. A., Allen, J., Bloom, S. E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schrek, R., Tice, R., Whitfield, B., Wolff, S. Sister chromatide exchange: a reported of the gene tox program. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 87, p.17-62, 1981.
58. Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., et al. A new Salmonella tester strain (TA 102) with AT base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Procedings National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.79, p.7445-7449, 1982 b.
59. Levin, D. E., Yamashi, E., Ames, B. N. A new Salmonella tester strain for the detection of frameshift mutagens: a run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutation Research*, Amsterdam, v.94, p.315-330, 1982 a.

60. Lijinski, W. A view of the relation between carcinogenesis and mutagenesis. *Environmental Molecular and Mutagenesis*, Washington, v.14, suppl. 16, p.78-84, 1989.
61. Little, J. W., Mount, D. W. The SOS regulatory systems of *Escherichia coli*. *Cell*, Cambridge, v.29, p.11-22, 1982.
62. Loeb, L. A. A mutation phenotype in cancer. *Cancer Research*, Baltimore, v.61, p. 3230-3239, 2001.
63. Loeb, L., Loeb, K. R., Anderson, J. P. Multiple mutations and cancer. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.100, p.776-781, 2003.
64. Maron, D. M., Ames, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, Amsterdam, v.113, p.173-215, 1983.
65. Matter, B. E., Tsuchimoto, T. Mutagenicity test system for the detection of chromosome aberrations in vivo. *Archives of Toxicology*, Berlin, v.46, p.89-98, 1980.
66. Mccan, J., Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, Washington, v.73, p.950-954, 1986.
67. Mccan, J., Choi, E., Yamasasaki, E., et al. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of American*, Washington, v.72, p.5135-5139, 1975 a.
68. Mccann, J. N.; Spingarn, E.; Kabori, J.; Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens bacterial teste strains with R factor plasmids. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v.72, p.979-983, 1975 b.

69. Mol, C. D.; Parikh, S. S.; Putnam, C. D.; Lo, T. P.; Tainer, J. A DNA repair mechanisms for the recognitions and removal of damaged DNA bases. *Annual Review of Biophysics Biomolecular Structure*, Palo Alto, v.28, p.101-128, 1999.
70. Moorehead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Batipps, D. M., Hungerford, D. A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, New York, v.20, p.613, 1960.
71. Natarajan, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, Amsterdam, v.504 (1-2), p.3-16, 2002.
72. Natarajan, A. T., Obe, G. How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* in their ability to detect mutagens. *Mutation Research*, Amsterdam, v.167, p.189-201, 1986.
73. Nestmann, E. R., Brillinger, R. L., Mcpherson, M. F., Maus, K. L., The simultest: a new approach to screening chemical with the Salmonella reversion assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Washington, v.10, p.169-181, 1987.
74. Obe, G.; Pfeiffer, P.; Savage, J. R. K.; Johannes, C.; Goedecke, P. J.; Natarajan, A. T; Martinez-Lopez, W.; Folioe, G. A.; Drets, M.E. Chromosome aberrations: formations, identification and distribution. *Mutation. Research*, Amsterdam, v.504, p-3-16, 2002.
75. Perera, F.P.-Molecular cancer epidemiology. A new tool in cancer prevention. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, Bethesda, 78:887-98, 1982.
76. Pierce, A. J.; Statk, J. M.; Araújo, F. D.; Moynahan, M. E.; Berwick, M.; Jasin, M. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends in Cell Biology*, Cambridge, v.11, p. S52-S59, 2001.
77. Preston, R. J. Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., Mcfee A. F., Shelby, M. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays; Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research*, Amsterdam, v.189, p.157-165, 1987b.

78. Preston, R. J., Au, W., Bender, M. A., Brewen, J. G., Carrano, A. V., Hddle, J. A., Mcfee, A. F., Wolff, S., Wassom, J. S. Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays Mutation Research, Amsterdam, v.87, p.143-188, 1981.
79. Preston, R. J., Dean, B. J., Mcfee, A. F. The *in vitro* human lymphocyte assay. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. Mutation Research, Amsterdam, v.189, p.157-165, 1987a.
80. Rouse, J.; Jackson, S. P. Interfaces between the detection signaling, and repair of DNA damage. Science, Washington, v.297, p.547-551, 2002.
81. Salles, B., Paolettu, C. Control of UV induction of RecA protein. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Washington, v.80, p.65-69, 1983.
82. Sarasin, A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Research, Amsterdam, v.544, p.99-106, 2003.
83. Savage, J. R. K. A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. Mutation Research, Amsterdam, v.207, p33-36, 1988.
84. Savage, J. R. K. Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. Journal of Medical Genetics, London, v.12, p.103-122, 1975.
85. Schmid, W. The micronucleus test. Mutation Research, Amsterdam, v.31, p.9-15, 1975.
86. Slagboom, P. E., Vijg, J. Genetic instability and aging: theories, facts and future perspectives. Genome, Ottawa, v.31, p.373-385, 1989.
87. Snustad, D. P., Simmons, M. J. Fundamentos da Genética, 2ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000, p.756.

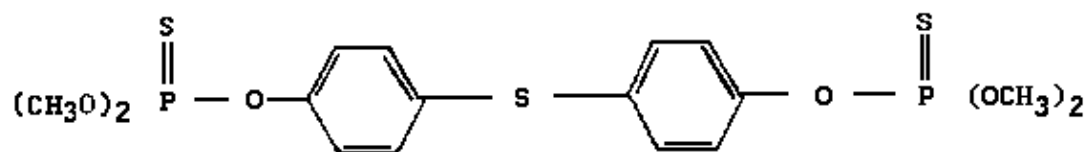
88. Suzuki, Y., Nagae, Y., Ishikawa, Y., Watanabe, Y., Nagashima, K., Matsukubo, K., Schimizu, H. Effect of erythropoietin on the micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Washington, v.13, p.314-318, 1989a.
89. Suzuki, Y., Nagae, Y., L, J., Sakaba, H., Mozawa, K., Takahashi, A., Schimizu, H. The micronucleus test and erythropoiesis: Effect of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polichromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). *Mutagenesis*, Oxford, v.4, p.420-424, 1989 b.
90. Takebe, H., Nishigore, C., Satoh, Y. Genetics and skin cancer of xeroderma pigmentosum in Japan. *Japanese Journal of Cancer Research*, Tokyo, v.78, p.1135-1143, 1987.
91. Trucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. T., Carrano, A. V. Sister chromatide exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutation Research*, Amsterdam, v.297, p.101-180, 1993.
92. Trucker, J. D., Christensen, M. L., Strout, C. L., Carrano, A. V. Determination of the baseline sister-chromatid exchanges, frequency in human and mouse peripheral lymphocytes using monoclonal antibodies and very low doses of bromodeoxyuridine. *Cytogenetics and Cell Genetics*, Basel, v.43, p.38-42, 1986.
93. Vijg, J., Gossen, J. A. Somatic mutations and cellular aging. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Oxford, v.104 B, n. 3, p.429-437, 1993.
94. Villa, L. L., Brentani, R. R. Base molecular da mutação. In: COSTA, S. O. P. *Genética molecular e de microorganismos - Fundamentos da engenharia genética*. São Paulo, Editora Manole, 1987. cap.29, p.470-480.
95. Von Ledebur, M., Schmid, W. The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutation Research*, Amsterdam, v.19, p.109-117, 1973.

96. Walker, G. C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews, Washington, v.48, p.60-93, 1984.
97. Yagi, T., Sato, M., Tatsumi-Miyajima, J., Takebe, H. UV-induced base substitution mutations in a shuttle vector plasmid propagated in group C xeroderma pigmentosum cell. Mutation Research, Amsterdam, v.273, p. 213-220, 1992.
98. Zambrano, M. A., Targa, H. J., Rabello-Gay, M. N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. Stain Technology, Baltimore, v.57,48-9,1982.

6. - MATERIAL E MÉTODO

6.1. Inseticida Sintético Organofosforado:

- Temefós (grau técnico 95,5%). w.w. - FERSOL (R – 0259/05)
(0,0,0',0'-tetramethyl 0,0'-thiodi-p- phenylenephosphorothioate)



6.2. - Larvicida microbiano: *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti)

- Bti padrão (liofilizado) – IPS 82, isolado 1884, no Instituto Pasteur, França. Amostra gentilmente cedida pela equipe Bactéries Entomopathogènes, Inst. Pasteur.

6.3. - Fármaco com ação antineoplásica e citostática: Ciclofosfamida (SIGMA®)

- (tetra-hidro-2H-1,3,2-Oxazaphosphorin-2-amine-2-oxide)

6.4. - Outros materiais utilizados:

- a) Colchicina (Sigma ®);
- b) Cloreto de Sódio PA (Merck);
- c) Cloreto de Potássio PA (Merck);
- d) Ácido Acético Glacial PA (Merck);
- e) Giemsa (Merck);
- f) Acetona PA (Merck);
- g) Xilol PA (Merck);
- h) Metanol PA (Merck).

6.5. - Metodologia:

6.5.1. - Animais experimentais:

Os ensaios foram realizados com camundongos (*Mus musculus*) albinos *Swiss Webster*, fornecidos pelo biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ – Recife PE.

Foram utilizados 410 animais de ambos os sexos, com 40 dias de vida e peso médio de 25 a 30 g foram mantidos em gaiolas apropriadas, aclimatadas sob temperatura de 20°C, com ciclos de iluminação (claro / escuro) de 12 horas. O estado nutricional dos animais foi acompanhado por veterinários, sendo oferecido diariamente, ração balanceada e água filtrada sem restrições. Antes da realização dos experimentos passaram por um período de oito dias, em quarentena, no biotério de experimentação.

Foram administrados aos camundongos o organofosforado temefós (grau técnico, 95,5%) e a cepa padrão de *Bti* (IPS 82).

As soluções do Temefós (grau técnico 95,5%) na concentração de 32,14 mg/mL e a água destilada estéril (controle negativo), foram administradas via oral por gavagem (10mL/kg). A Ciclofosfamida (1%) foi administrada, via i.p., (25mg/kg). A Ciclofosfamida e o temefós foram diluídos em água destilada estéril.

A cepa padrão de *Bti* (IPS 82) foi diluída em água destilada estéril para obter uma suspensão estoque de 5g/L (20.400 UFC/L - Unidades Formadoras de Colônia por litro). Foram administradas, via oral por gavagem, água destilada estéril (10mL/kg), como controle negativo, e a suspensão de *Bti* nas concentrações de 204 (20,4 x 10¹⁰) e 122,4 (20,4 x 10⁶) UFC/L.

Os experimentos foram realizados empregando-se os testes de micronúcleo e de metáfase em células de medula óssea de camundongos, os animais foram divididos em grupos de 05 / gaiola / sexo, segundo os protocolos.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, registrado e licenciado sob o número L-054/08 – Val. 30/06/2012 (Certificado - Anexo).

6.6. - Teste de Micronúcleos em células de medula óssea de camundongos (Schmid, 1975).

6.6.1. - Inseticida Sintético Temefós - protocolo Metodológico

Protocolo Grupo – 1: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [111 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 24 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 2: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [55,5 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 24 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 3: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [27,75 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 24 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 4: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [111 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 48 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 5: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [111 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 72 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 6: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [111 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 1 dose / semana (9 doses)

Os experimentos consistiram em administrar aos camundongos, via oral (gavagem) [10 mL/kg] o Temefós nas concentrações de 111,00 mg/kg (DMT), 55,5 mg/kg e 27,75 mg/kg, sendo 05 camundongos grupo / sexo / dose. Em cada grupo foram inoculados como controle positivo, via i.p., cinco camundongos / sexo com Ciclofosfamida [25 mg/kg]. Para o controle negativo foi administrado, via oral por gavagem [10 mL/kg], água destilada estéril.

6.6.2. – Larvicida microbiano: *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) - protocolo metodológico

Protocolo Grupo – 7: Número de animais 20 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a suspensão de Bti IPS – 82 [$20,4 \times 10^{10}$] = 204 UFC (Unidade Formadora de Colônia)

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 24 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 8: Número de animais 20 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a suspensão de Bti IPS – 82 [$20,4 \times 10^6$] = 122,4 UFC

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 24 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 9: Número de animais 20 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a suspensão de Bti IPS – 82 [$20,4 \times 10^{10}$] = 204 UFC

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 48 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 10: Número de animais 20 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a suspensão de *Bti* IPS – 82 [$20,4 \times 10^6$] = 122,4 UFC

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 mL/kg]

Período de exposição: 48 horas (dose única).

A cepa de *Bti* IPS – 82 (liofilizada) foi ressuspensa em água destilada estéril (0,05g/10ml), obtendo-se uma suspensão estoque de 5g/L. Desta suspensão, foram plaqueados 5 µl em placas de Petri contendo meio Agar nutritivo (pH= 7,0) e incubado a 37°C durante 18h. Foram contabilizadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) resultando em 20.400 UFC/L na suspensão estoque.

Os experimentos consistiram em administrar aos camundongos, via oral (gavagem), 50 µl de suspensão de *Bti* IPS – 82, nas concentrações de 204 e 122,4 UFC, sendo 05 camundongos grupo / sexo / dose. No grupo controle negativo foi administrado água destilada estéril, via oral por gavagem, 10 mL/kg de peso corporal.

6.6.3. - Teste de micronúcleo (descrição metodológica)

Após 24 horas, decorrido o tempo de permanência da administração dos larvicidas, temefós e *Bti*, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, os fêmures foram extirpados, dissecados e cortados às epífises proximais. Com uma seringa e agulha tipo tuberculina foi injetado no canal medular dos fêmures dos camundongos 1,0 mL de soro fetal bovino, dentro de um tubo de centrífuga contendo 2,0 mL do soro fetal bovino. A suspensão de células foi homogeneizada várias vezes com pipeta Pasteur fina e, em seguida, centrifugaram-se o material a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado deixando-se cerca de 1 mL no tubo. Para a confecção do esfregaço, ressuspendeu-se o sedimento e com 2 ou 3 gotas foram espalhadas com 2 lâminas, limpas e secas, deslizando uma sobre a outra. Após secagem total das preparações citológicas as lâminas foram colocadas em berço para coloração e submersas em cubas contendo 250 mL de metanol, sendo fixadas por 10 minutos.

As lâminas foram coradas 24 horas após a realização dos testes. Utilizou-se uma bateria composta por 4 cubas. As lâminas foram colocadas na 1ª cuba contendo 200 ml de corante

Leishman puro, deixando-as submersas por 3 minutos. Retiradas e, submersas novamente durante 15 minutos na 2ª cuba, contendo 200 mL do corante Leishman diluído em água destilada estéril na proporção de 1:6. Em seguida lavadas várias vezes em água corrente e água destilada e finalmente, colocada em uma 3ª cuba contendo 200 mL de acetona onde permaneceram submersas durante 10 minutos (Fluxograma 1 – Anexo). As preparações citológicas foram protegidas por lamínulas fixadas às lâminas com bálsamo do Canadá diluído em xilol (1:1).

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (10 x 100), obedecendo-se os critérios: a) identificação da lâmina correspondente ao animal; b) contagem total dos eritrócitos policromáticos (PCE); c) total de PCE micronucleados.

6.6.4. - Teste de Metáfase em Células de Medula Óssea de Camundongos (Hsu e Patton, 1969; Zambrano *et al*, 1982).

6.6.5. - Inseticida Sintético Temefós (grau técnico 95,5%) - protocolo metodológico:

Protocolo Grupo – 10: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [111 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 ml/kg]

Período de exposição: 24 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 11: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [55,5 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 ml/kg]

Período de exposição: 24 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 12: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [27,75 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 ml/kg]

Período de exposição: 24 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 13: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [111 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 ml/kg]

Período de exposição: 48 horas (dose única)

Protocolo Grupo – 14: Número de animais 30 camundongos

10 camundongos (5 / sexo) administrados com a solução de Temefós [111 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) inoculados com a Ciclofosfamida [25 mg/kg]

10 camundongos (5 / sexo) administrados com água destilada estéril [10 ml/kg]

Período de exposição: 72 horas (dose única)

Os experimentos consistiram em administrar aos camundongos, via oral (gavagem), o Temefós nas concentrações de 111,00 mg/kg, Dose Máxima Tolerada (DMT), 55,5 mg/kg e 27,75 mg/kg, sendo 05 camundongos grupo / sexo / dose. Em cada grupo foram inoculados como controle positivo, via i.p., cinco camundongos / sexo com Ciclofosfamida [25 mg/kg]. Para o controle negativo foi administrado, via oral por gavagem [10 ml/kg], água destilada estéril. Uma solução de Colchicina (1%) foi inoculada, via i.p., na dose de 10 ml/kg de peso corporal 22 horas após a última inoculação e, 2 horas depois, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.

6.6.6. - Descrição metodológica - teste de metáfase

Após 24 horas, decorrido o tempo de permanência, da administração do inseticida temefós os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, os fêmures foram extirpados, dissecados e cortados às epífises proximais. As medulas óssea foram extraídas através da injeção no canal medular dos fêmures dos camundongos, 1,0 ml de NaCl (0,9%) com seringa e agulha tipo tuberculina, sendo colocada dentro de um tubo de centrífuga contendo 2,0 ml da solução de NaCl (0,9%). A suspensão de células foi homogeneizada várias vezes com uma pipeta

Pasteur fina e, em seguida, centrifugadas a 1.000 r.p.m durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento e adicionou-se 4 ml de solução hipotônica gelada de KCl (0,075M), ficando em repouso, à temperatura ambiente, durante 25 minutos (hipotenização das células), sendo em seguida, centrifugada a 1.000 (r.p.m) durante 5 minutos e descartado o sobrenadante. Ao sedimento adicionou-se 4 ml de fixador metanol / ácido acético (3:1), recém preparado, sendo as células ressuspensas até obter-se uma solução homogênea e sem grumos (repetir 2 vezes). Após a última centrifugação, descartou-se parte do sobrenadante, ficando cerca de 1 ml para fazer as preparações citológicas. Ressuspendeu-se as células e em lâminas previamente limpas e totalmente desengorduradas, mantidas submersas em água destilada gelada, gotejou-se 2 a 3 gotas do material sobre uma película d'água sobre as lâminas. As preparações citológicas foram ligeiramente flambadas em lamparina a álcool, ficando em repouso durante 12 horas.

A coloração foi processada 24 horas após a realização do teste em cubas contendo 250 ml de soluções para coloração, segundo o protocolo: na 1ª cuba contendo solução de Giemsa / água (10%), recém-preparada, na qual as lâminas foram submersas durante 07 minutos; nas 2ª e 3ª cubas contendo acetona, as lâminas foram mergulhadas por três vezes consecutivas em cada uma; na 4ª cuba com acetona: xilol (1:1), as lâminas foram mergulhadas por três vezes consecutivas; nas 5ª e 6ª cubas contendo xilol, as lâminas foram submersas durante 10 minutos em cada cuba (Fluxograma 2 – Anexo). As preparações citológicas foram protegidas por lamínulas e fixadas com bálsamo do Canadá / xilol (1:1).

Para análise cromossômica foram consideradas as metáfases que apresentassem: a) número completo de cromossomos na metáfase ($2n = 40$); b) alinhamento das cromátides; c) cromossomos não sobrepostos; d) boa fixação e coloração das células; e) tipos de aberrações cromossômicas. As lâminas foram analisadas em sistema duplo cego, em microscopia óptica com objetiva de imersão (10 x 100), 50 metáfases (por animal/dose/grupo) e classificadas: i) quanto ao nível de mutações cromossômicas (aberrações), tipos: quebra cromossômica, quebra cromatídica, rearranjos, anel, perda de fragmentos (GAPS), fragmentos acêntrico simples (FAS) e duplos (FAD), ii) quanto ao nível de mutações genômicas (aneuploidias ou poliplóidias). (PRESTON *et al* 1981, 1987a).

6.6.7. - Avaliação de Citotoxicidade, através do índice mitótico (I. M%), no teste de metáfase.

O grau de toxidez do Temefós (grau técnico 95,5%), assim como, da Ciclofosfamida (controle positivo) e da água (controle negativo) foi determinado através do cálculo do índice mitótico, empregando-se a formula:

$$\text{IM (\%)} = \text{N}^{\circ} \text{ células metafásicas} \times 100 / \text{total de células.}$$

6.7 - Análises Estatística

6.7.1. - Foi aplicado o teste do qui-quadrado de proporções do Soft Epi - Info - 6.04, ao nível de significância de 5%. Na escolha do teste levou-se em consideração o esquema experimental, e as transformações necessárias para que se façam comparações múltiplas dos resultados.

6.7.2. - Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Shapiro Wilk e para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado t-student. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2000 e o R v 2.8.0.

A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como média e desvio padrão. Os softwares utilizados foram o Excel 2000 e o R v 2.8.0.

Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Shapiro Wilk e para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado t-Student. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

CAPÍTULO VII
RESULTADOS E DISCUSSÃO

7. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. – Teste de micronúcleo em grupos expostos ao inseticida temefós

Os resultados do teste de micronúcleo em células de medula óssea de camundongos expostos ao inseticida organofosforado temefós (grau técnico 95,5%), estão descritos no artigo: Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos (MELO, *et al.*, 2008) (Capítulo 4).

7.2. – Teste de metáfase em grupos expostos ao inseticida temefós (Dados ainda não estão publicados. Resumo publicado no 54º Congresso Brasileiro de Genética - Anexo).

A análise estatística dos testes de metáfase, em células de medula óssea de camundongos de ambos os sexos, expostos ao temefós mostrou que:

1 - Ao nível de significância de 5%, os percentuais de aberrações cromossômicas (AC), induzidos por Temefós nas doses de: 111, 55,5 e 27,75 mg/kg diferiram significativamente ($p = 0,0001$) entre os camundongos machos e fêmeas ($p = 0,0961$), apresentando diferença percentual de AC proporcional às doses, em ambos os sexos. O percentual de AC foi significativamente maior ($p = 0,0001$), em todas as dosagens, nos camundongos fêmeas no controle positivo (CPA 25 mg/kg). Nos camundongos machos, apenas na dose de 27,75 mg/kg, as AC foram significativamente maiores ($p = 0,0001$) do que no controle positivo. Quando comparado com o controle negativo (água 10 ml/kg), só o Temefós induziu AC, em todas as doses nos camundongos de ambos os sexos, em avaliação feita 24h após tratamento único (Tab. 2 e 3).

2 – Os Índices Mitóticos (I.M %), observados com o Temefós nas doses de 111, 55,5 e 27,75 mg/kg, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, ao nível de 5%, dos observados no controle positivo (CPA 25 mg/kg) para os camundongos de ambos os sexos. Apresentou aumento percentual em relação às fêmeas, na dose de 111 mg/kg, mas sem diferença significativa. Diferiram significativamente ($p = 0,0001$) do controle negativo nos camundongos de ambos os sexos, avaliados 24h após tratamento único (Tab. 4).

3 - Ao nível de significância de 5%, os percentuais de AC induzidos por Temefós 111 mg / kg e CPA 25 mg/kg, apresentaram diferenças significativas ($p = 0,0001$) para os camundongos em ambos os sexos. Apresentando déficit percentual de AC, proporcional ao tempo de exposição, com diferença significativa ($p = 0,0001$) entre os camundongos machos. Comparado ao controle negativo, o Temefós induziu AC, em todas as doses nos camundongos de ambos os sexos, avaliados 24, 48 e 72h após tratamento (Tab. 2, 3, 5, 6, 7, 8).

4 – Os resultados dos I.M%, com o Temefós na dose de 111 mg / kg, apresentaram diferenças significativas ($p = 0,0001$), ao nível de significância de 5%, entre os camundongos de ambos os sexos em relação ao período de exposição. Em relação ao controle positivo houve diferença significativa para os camundongos machos ($p = 0,0001$) e para as fêmeas ($p = 0,0003$). Nos grupos tratados com o controle negativo, o I.M. diferiu significativamente ($p = 0,0001$) nos camundongos de ambos os sexos, avaliados 24, 48 e 72h após tratamento único (Tab. 9).

7.3. – Teste de Metáfases: tabelas

7.3.1. - Tabela 2 - Resultado das análises dos cromossomos em células metafásicas, da medula óssea de camundongos machos, tratados com Temefós (grau técnico) a 95,5% e Ciclofosfamida (CPA) e água destilada, em dose única, analisadas 24 horas após tratamento.

Produtos Testados	Dose Única (mg/kg)	Sexo / Nº Animais	Células Analisadas animal/total	Células Normais total / (%)	Células com Aberrações Cromossômicas total / (%) ^(d)	Número total e percentual (%) de células por tipos de aberrações cromossômicas ^(a)									
						MD (%)		GAP (%)		Q.CRT (%)		FAS (%)		FAD (%)	
Temefós	111,0	M 05	50 250	69 27,6	181 72,4	0 0		4 1,6		2 0,8		10 4,0		165 66,0	
	55,5	M 05	50 250	82 32,8	168 67,2	2 0,8		4 1,6		2 0,8		26 10,4		134 53,6	
	27,75	M 05	50 250	132 52,8	118 47,2	0 0		2 0,8		1 0,4		13 5,2		102 40,8	
CPA ^(b)	25	M 05	50 250	88 35,2	162 64,8	0 0		8 3,2		9 3,6		21 8,4		124 49,6	
Água ^(c)	10	M 05	50 250	249 99,6	1 0,4	0 0		0 0		0 0		0 0		0 0	

(a) Tipos de Aberrações Cromossômicas: Células muito danificada (MD); Células com pequenas falhas (GAP); Células com quebras Cromatídica (Q. CRT); Fragmento acêntrico simples (FAS); Fragmento acêntrico duplo (FAD).

(b) Ciclofosfamida (Controle positivo); (c) Controle negativo (água destilada - ml/kg);

(d) Estatisticamente significativo

7.3.1. - Tabela 3 - Resultado das análises dos cromossomos em células metafásicas, da medula óssea de camundongos fêmeas, tratados com Temefós (grau técnico) a 95,5% e Ciclofosfamida (CPA) e água destilada, em dose única, analisadas 24 horas após tratamento.

Produtos Testados	Dose Única (mg/kg)	Sexo / N° Animais	Células Analisadas animal/total	Células Normais total / (%)	Células com Aberrações Cromossômicas total / (%) ^(d)	Número total e percentual (%) de células por tipos de aberrações cromossômicas ^(a)									
						MD (%)		GAP (%)		Q.CRT (%)		FAS (%)		FAD (%)	
Temefós	111,0	F 05	50 250	234 93,6	16 6,4	0 0	5 2,0	2 0,8	4 1,6	5 2,0					
	55,5	F 05	50 250	238 95,2	12 4,8	0 0	2 0,8	2 0,8	8 3,2	9 3,6					
	27,75	F 05	50 250	244 97,6	6 2,4	1 0,4	2 0,8	0 0	3 1,2	4 1,6					
CPA ^(b)	25	F 05	50 250	193 77,2	57 22,8	4 1,6	10 4,0	13 5,2	26 10,4	4 1,6					
Água ^(c)	10	F 05	50 250	250 100	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0,4	0 0					

(a) Tipos de Aberrações Cromossômicas: Células muito danificada (MD); Células com pequenas falhas (GAP); Células com quebras Cromatídica (Q. CRT); Fragmento acêntrico simples (FAS); Fragmento acêntrico duplo (FAD).

(b) Ciclofosfamida (Controle positivo); (c) Controle negativo (água destilada - ml/kg)

(d) Estatisticamente significativo

7.3.1. - Tabela 4 - Determinação dos valores dos índices mitóticos em células Metafásicas, da medula óssea de camundongos machos e fêmeas, tratados com Temefós (grau técnico) a 95,5% e Ciclofosfamida (CPA) e água destilada, em dose única, analisadas 24 horas após tratamento.

Produtos Testados	Dose Única (mg/Kg)	Número de Animais / Sexo	Células analisadas Animal / Total		Índice Mitótico (%) ^(c) Macho / Fêmea	
Temefós	111	05	1000	5000	1,53	2,33
	55,5	05	1000	5000	1,85	1,68
	27,75	05	1000	5000	1,33	1,63
	25	05	1000	5000	1,59	1,41
CPA ^(a)						
Água ^(b)	10	05	1000	5000	4,50	4,50

(a) Controle positivo (CPA)

(b) Controle negativo (água destilada – ml/kg)

(c) Estatisticamente significativo

7.3.1. - Tabela 5 - Resultado das análises dos cromossomos em células metafásicas, da medula óssea de camundongos machos, tratados com Temefós (grau técnico) a 95,5% e Ciclofosfamida (CPA) e água destilada, em dose única, analisadas 48 horas após tratamento.

Produtos Testados	Dose Única (mg/kg)	Sexo / N° Animais	Células Analisadas animal/total	Células Normais total / (%)	Células com Aberrações Cromossômicas total / (%) ^(d)	Número total e percentual (%) de células por tipos de aberrações cromossômicas ^(a)				
						MD (%)	GAP (%)	Q.CRT (%)	FAS (%)	FAD (%)
Temefós	111,0	M 05	50 250	170 68,0	80 32,0	0 0	7 2,8	3 1,2	25 10,0	55 22,0
CPA ^(b)	25	M 05	50 250	178 71,2	72 28,8	2 0,8	6 2,4	4 1,6	28 11,2	38 15,2
Água ^(c)	10	M 05	50 250	250 100	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

(a) Tipos de Aberrações Cromossômicas: Células muito danificada (MD); Células com pequenas falhas (GAP); Células com quebra Cromatídica (Q. CRT); Fragmento acêntrico simples (FAS); Fragmento acêntrico duplo (FAD).

(b) Ciclofosfamida (Controle positivo); (c) Controle negativo (água destilada – ml/kg);

(d) Estatisticamente significativo

7.3.1. - Tabela 6 - Resultado das análises dos cromossomos em células metafásicas, da medula óssea de camundongos fêmea, tratados com Temefós (grau técnico) a 95,5% e Ciclofosfamida (CPA) e água destilada, em dose única, analisadas 48 horas após tratamento.

Produtos Testados	Dose Única (mg/kg)	Sexo / Nº Animais	Células Analisadas animal/total		Células Normais total / (%)		Células com Aberrações Cromossômicas total / (%) ^(d)		Número total e percentual (%) de células por tipos de aberrações cromossômicas ^(a)									
									MD (%)		GAP (%)		Q.CRT (%)		FAS (%)		FAD (%)	
Temefós	111,0	F 05	50	250	201	80,4	19	7,6	0	0	4	1,6	0	0	19	7,6	26	10,4
CPA ^(b)	25	F 05	50	250	160	64,0	90	36,0	3	1,2	4	1,6	6	2,4	37	14,8	40	16,0
Água ^(c)	10	F 05	50	250	250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(a) Tipos de Aberrações Cromossômicas: Células muito danificada (MD); Células com pequenas falhas (GAP); Células com quebras cromatídica; (Q. CRT); Fragmento acêntrico simples (FAS); Fragmento acêntrico duplo (FAD).

(b) Ciclofosfamida (Controle positivo);

(c) Controle negativo (água destilada – ml/kg);

(d) Estatisticamente significativo

7.3.1. - Tabela 7 - Resultado das análises dos cromossomos em células metafásicas, da medula óssea de camundongos machos, tratados com Temefós (grau técnico) a 95,5% e Ciclofosfamida (CPA) e água destilada, em dose única, analisadas 72 horas após tratamento.

Produtos Testados	Dose Única (mg/kg)	Sexo / N° Animais	Células Analisadas animal/total	Células Normais total / (%)	Células com Aberrações Cromossômicas total / (%) ^(d)	Número total e percentual (%) de células por tipos de aberrações cromossômicas ^(a)							
						MD (%)		GAP (%)		Q.CRT (%)		FAS (%)	
Temefós	111,0	M 05	50 250	215 86	35 14	0 0	3 1,2	0 0	19 7,6	21 8,4			
CPA ^(b)	25	M 05	50 250	202 80,8	48 19,2	1 0,4	6 2,4	6 2,4	15 6,0	22 8,8			
Água ^(c)	10	M 05	50 250	250 100	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0			

(a) Tipos de Aberrações Cromossômicas: Células muito danificada (MD); Células com pequenas falhas (GAP); Células com quebras cromatídica; (Q. CRT); Fragmento acêntrico simples (FAS); Fragmento acêntrico duplo (FAD).

(b) Ciclofosfamida (Controle positivo);

(c) Controle negativo (água destilada – ml/kg);

(d) Estatisticamente significativo

7.3.1. - Tabela 8 - Resultado das análises dos cromossomos em células metafásicas, da medula óssea de camundongos fêmea, tratados com Temefós (grau técnico) a 95,5% e Ciclofosfamida (CPA) e água destilada, em dose única, analisadas 72 horas após tratamento.

Produtos Testados	Dose Única (mg/kg)	Sexo / Nº Animais	Células Analisadas animal/total	Células Normais total / (%)	Células com Aberrações Cromossômicas total / (%) ^(d)	Número total e percentual (%) de células por tipos de aberrações cromossômicas ^(a)									
						MD (%)	GAP (%)	Q.CRT (%)	FAS (%)	FAD (%)					
Temefós	111,0	F 05	50 250	224 89,6	26 10,4	0 0	6 2,4	0 0	8 3,2	15 6,0					
CPA ^(b)	25	F 05	50 250	195 78,0	55 22,0	3 1,2	6 2,4	6 2,4	18 7,2	25 10,0					
Água ^(c)	10	F 05	50 250	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0					

(a) Tipos de Aberrações Cromossômicas: Células muito danificada (MD); Células com pequenas falhas (GAP); Células com quebras cromatídica (Q. CRT); Fragmento acêntrico simples (FAS); Fragmento acêntrico duplo (FAD).

(b) Ciclofosfamida (Controle positivo);

(c) Controle negativo (água destilada – ml/kg);

(d) Estatisticamente significativo

7.3.1. - Tabela 9 – Determinação dos valores dos índices mitóticos em células metafásicas, da medula óssea, de camundongos machos e fêmeas, tratados com Temefós (grau técnico), Ciclofosfamida (CPA) e água destilada, em dose única, analisadas 24, 48 e 72 horas após tratamento em relação à dinâmica na proliferação celular.

Produtos Testados	Dose Única (mg/Kg)	Nº Animais / Sexo	Células analisadas Animal / Total		ÍM (%) ^(c) (24h)		ÍM (%) ^(c) (48h)		ÍM (%) ^(c) (72h)	
					Macho / Fêmea		Macho / Fêmea		Macho / Fêmea	
Temefós	111	05	1000	5000	1,53	2,33	1,71	1,98	3,21	3,26
CPA ^(a)	25	05	1000	5000	1,42	1,46	1,48	1,52	1,60	1,72
Água ^(b)	10	05	1000	5000	4,50	4,50	4,40	4,46	4,45	4,48

(a) Controle positivo (CPA)

(b) Controle negativo (água destilada – ml/kg)

(c) Estatisticamente significativo

Nossos resultados demonstram a ação mutagênica, induzida pelo inseticida químico Temefós – grau técnico 95,5%, em células de medula óssea de camundongos de ambos os sexos, com a formação de micronúcleo (Fig.2), em eritrócitos policromáticos (PCE MN) nas concentrações de 27,75, 55,50 e 111,00 mg/kg peso corporal, 24h após tratamento único. E na concentração de 111,00 mg/kg, após 24, 48, 72h de tratamento único e após 9 doses (1 dose/semana) de tratamento. A frequência de (PCE MN) induzida pelo Temefós nos camundongos machos, foi superior à do controle positivo (CPA), em todas as concentrações e ao tempo de exposição (MELO *et al.*, 2008).

Nos testes de metáfase o Temefós grau técnico, induziu aberrações cromossômicas, em células de medula óssea de camundongos (Fig. 3), nas concentrações de 27,75, 55,50 e 111,00 mg/kg peso corporal, em ambos os sexos, 24h após tratamento único. E igualmente na concentração de 55,50 e 111,00 mg/kg às 24, 48 e 72h, após tratamento único. O Temefós induziu o percentual de aberrações cromossômicas superior ao controle positivo, nos camundongos machos, as 24 e 48h após tratamento único nas concentrações de 55,50 e 111,00 mg/kg.

A CPA recomendada em testes para detecção de genotoxicidade, como controle positivo, assegurou a confiabilidade dos experimentos realizados nos padrões estabelecidos.

São escassos os dados literários que se referem à genotoxicidade do Temefós, podendo ser citado o trabalho de Aiub et al., (2002), que mostra através do ensaio Cometa (SCGE), a genotoxicidade do Temefós, induzindo lesões grosseiras no DNA em doses acima de 1,34 μ M. No sistema SOS cromoteste, o Temefós foi mutagênico, porém não foi tóxico para a linhagem PQ37 de *Escherichia coli*, em concentrações acima de 1,33 μ M, sem adição da mistura S9. E empregando o teste de Ames com as linhagens de *Salmonella typhimurium*, o Temefós, com e sem adição da mistura S9 não foi mutagênico para as linhagens TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102. Entretanto revelou-se mutagênico, com e sem adição da mistura S9, para as linhagens TA 98 NR, YG 7104 e YG 7108 com concentrações acima de 3,33 μ M (Aiub et al., 2002).

Embora algumas análises feitas dos danos causados pelo uso destes compostos à saúde humana tenham sido, em sua maioria, restritas aos efeitos agudos, caracterizando um problema de Saúde Pública, a extensão no que concerne, sobretudo, aos efeitos crônicos, é pouco conhecida.

7.4. - Representação fotográfica de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN).

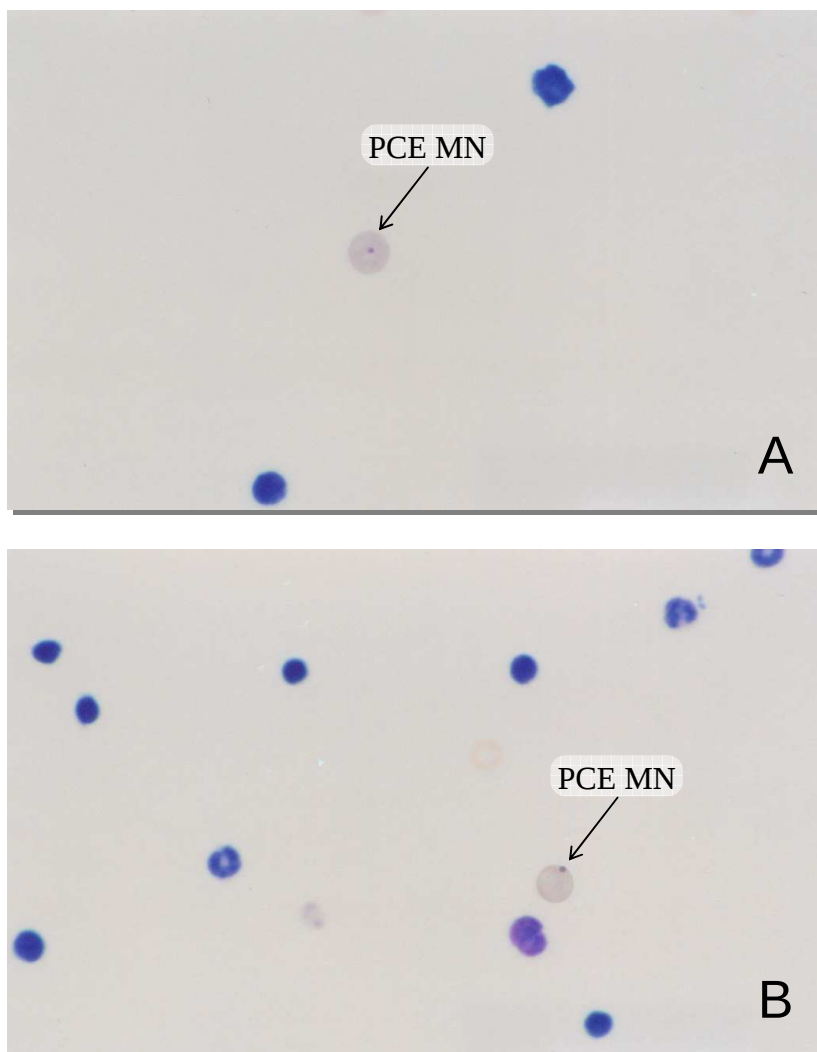


Figura 2- Eritrócitos policromáticos micronucleados (PCE) em células de medula óssea de camundongos tratados com Temephos - Grau Técnico (95,5%). (10 x 100x).

7.5. - Representação fotográfica de metáfases com aberrações cromossômicas

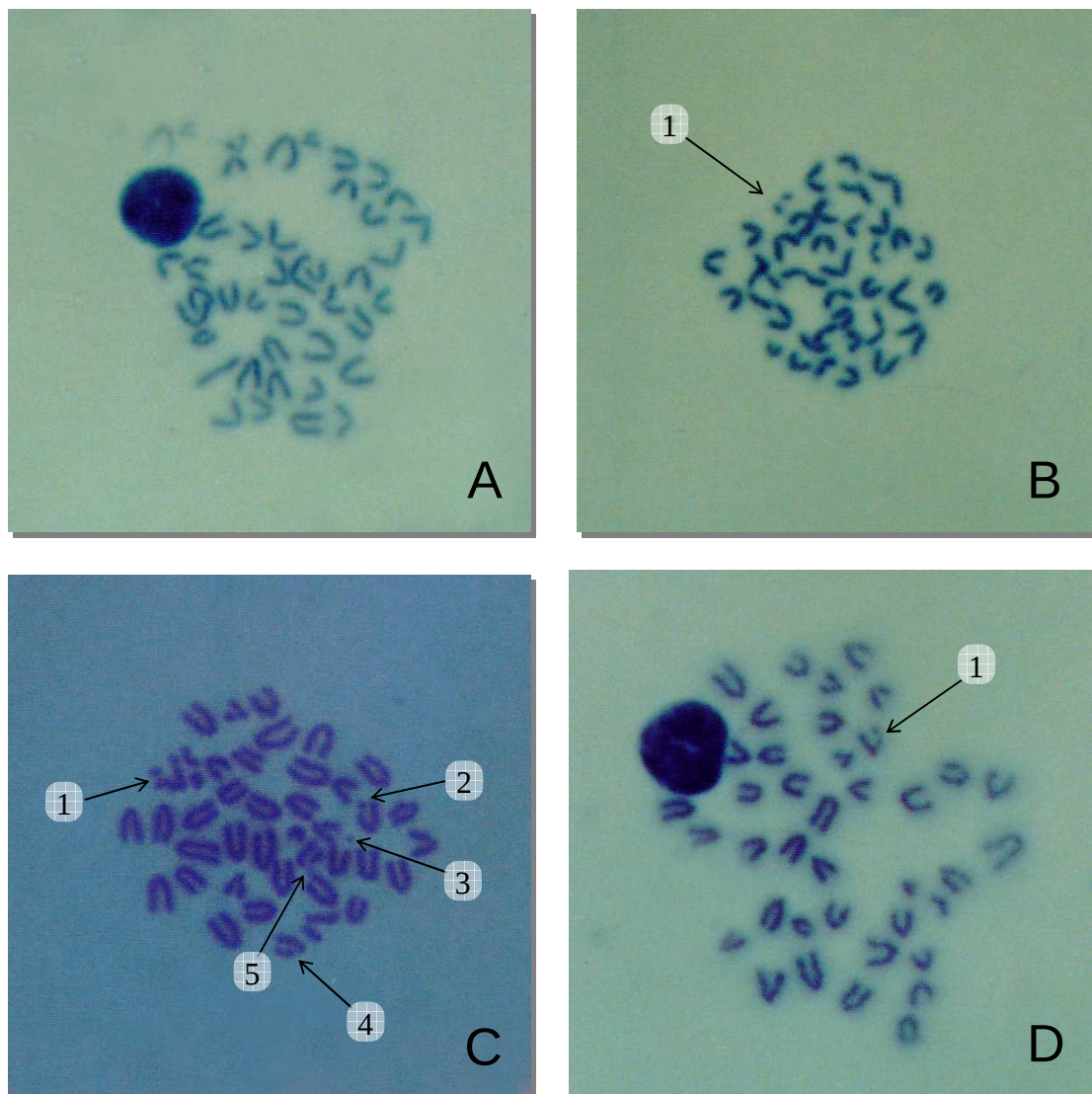


Figura 3- Aberrações Cromossômicas induzidas pelo inseticida Temefós Grau Técnico (95,5%): (A- Normal); (B: 1- FAD); (C: 1 e 5 – Q. Crmt.; 2 e 4 GAP; 3 - FAS); (D: 1- GAP). (10 x 100x).

Legenda:

Quebra cromatídica (Q. Crmt.)

Fragmento acêntrico duplo (FAD)

Deslocamento ou pequena quebra (GAP)

7.6. – Teste de micronúcleo: em grupos expostos ao larvicida microbiano *Bti* - IPS 82 padrão (Dados ainda não estão publicados).

Uma análise descritiva foi realizada para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas incluindo o uso de algumas medidas descritivas como, média e desvio padrão.

Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Shapiro Wilk e para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado o teste t Student. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

A citotoxicidade do *Bti* foi avaliada, através da análise das médias, em comparação com as doses, o sexo e o tempo de permanência.

Na análise citotóxica dos resultados através da análise das médias, em comparação com as doses, entre machos e fêmeas não foi observado diferença significativa ao nível de 5% (Tabela 10).

TABELA 10 - Análise citotóxica dos resultados obtidos após 24 e 48 horas do tratamento com *Bti* (204 e 122,4 UFC *) em camundongos machos e fêmeas.

Sexo	Tempo	Nº Animais	Media	Desvio Padrão	p-valor**
Masculino	24h	5	0,30	0,03	0,1113
<i>Bti</i> (204 UFC)	48h	5	0,34	0,03	
Fêmea	24h	5	0,34	0,02	0,4677
<i>Bti</i> (204 UFC)	48h	5	0,36	0,05	
Masculino	24h	5	0,34	0,02	0,7412
<i>Bti</i> (122,4 UFC)	48h	5	0,34	0,05	
Fêmea	24h	5	0,35	0,02	0,6644
<i>Bti</i> (122,4 UFC)	48h	5	0,36	0,02	

(UFC*) Unidade Formadora de colônia

(*Bti*) *Bacillus thuringiensis israelensis*

(p>0,05) ** estatisticamente insignificante ao nível de 5%

A citotoxicidade do *Bti* analisado, através da análise das médias, em comparação com as doses o sexo e o tempo de permanência, não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em comparação com o controle negativo (água) (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise citotóxica dos resultados obtidos após 24 e 48 horas do tratamento com água (200 µl) e *Bti* (204 e 122,4 UFC*) em camundongos machos e fêmeas.

Sexo	Tempo	Tratamento	Nº Animais	Media	Desvio Padrão	p-valor**
Macho	24h	Água	5	0,33	0,01	0,1753
		<i>Bti</i> (204 UFC)	5	0,30	0,03	
Fêmea	24h	Água	5	0,35	0,03	0,8242
		<i>Bti</i> (204 UFC)	5	0,34	0,02	
Macho	24h	Água	5	0,35	0,01	0,5116
		<i>Bti</i> (122,4 UFC)	5	0,34	0,02	
Fêmea	24h	Água	5	0,35	0,02	0,7731
		<i>Bti</i> (122,4 UFC)	5	0,35	0,02	
Macho	48h	Água	5	0,36	0,04	0,3419
		<i>Bti</i> (204 UFC)	5	0,34	0,05	
Fêmea	48h	Água	5	0,40	0,05	0,3640
		<i>Bti</i> (204 UFC)	5	0,36	0,02	
Macho	48h	Água	5	0,36	0,05	0,5150
		<i>Bti</i> (122,4 UFC)	5	0,34	0,03	
Fêmea	48h	Água	5	0,36	0,01	0,5668
		<i>Bti</i> (122,4 UFC)	5	0,36	0,05	

(UFC*) Unidade Formadora de Colônia

(*Bti*) *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*

(p>0,05) ** estatisticamente insignificante ao nível de 5%

O *Bti*, através dos experimentos realizados, não induziu a formação de micronúcleos, portanto, não foi considerado como um agente mutagênico. Estes achados estão em concordância com a revisão literária, na qual não foram encontrados relatos sobre a mutagenicidade e/ou genotoxicidade do *Bti* em células de mamíferos, quer seja através da administração oral (gavagem) ou adicionada a alimentos (DE BARJAC, 1990).

Estudos toxicológicos realizados em mamíferos mostraram que em coelhos e cobaias o *Bti* não produziu alterações na pele e nem irritação nos olhos. Em camundongos a administração oral, durante 3 semanas, também não apresentou efeitos toxicológicos significantes. Em duas gerações de camundongos não foi observada alteração quanto à mortalidade maternal, a fertilidade e o número de descendentes. Efeitos adversos de virulência, após 5 sucessivas passagens de esporos de *Bti* em camundongos, não foram observados (ADVISORY COMMITTEE ON PESTICIDES, 1992). Ensaio realizado em camundongos, ratos, coelhos e cobaias, através de inoculações (subcutânea, intraperitoneal, ocular), de aplicação percutânea, de inalação, da administração por gavagem, adicionada a alimentos ou por escarificação da pele, mostraram ausência de toxicidade aguda e crônica do *Bti* (DE BARJAC, 1990).

Apenas Mayes *et al.*, (1989), reportam efeitos do polipeptídeo de 28 kDa (Cyt1Aa) do cristal do *Bti*, produzindo hipotermia e bradicardia após administração, via i.p, em camundongos.

Estudos sobre a toxicidade do *Bti* demonstram, na maioria das circunstâncias, sua inocuidade para a fauna não-alvo encontrada nos criadouros de mosquitos, salvo para algumas espécies de quironomídeos (Díptera) (GARCIA *et al* 1980; ALI, 1981; MULLIGAN; SCHAEFER, 1982).

Nas duas últimas décadas, tem se observado um aumento progressivo do número de produtos à base de *Bti*, disponíveis no mercado mundial (Tabela 1). Estima-se que o consumo destes produtos deve aumentar consideravelmente, sobretudo devido ao impacto ambiental causado pelo uso de inseticidas químicos (ZAIM; GUILLET, 2002).

O uso de produtos contendo esporos viáveis de *Bti* em água potável sofreu, inicialmente, restrições por parte da Organização Mundial de Saúde por insuficiência de provas experimentais de sua inocuidade à saúde humana. Entretanto desde 1991 a Organização Mundial de Saúde recomenda a utilização de produtos contendo cristais e esporos viáveis, em formulação apropriada a este tipo particular de criadouro (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999).

8. - CONCLUSÕES:

1. – O inseticida organofosforado Temefós – (grau Técnico 95,5%) revelou-se genotóxico (clastogênico), via oral (gavagem), em células de medula óssea de camundongos de ambos os sexos, assim como, apresentou citotoxicidade, alterando a dinâmica da proliferação celular;
2. – O larvicida biológico *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (*Bti*) não se revelou como um agente mutagênico ou genotóxico (clastogênico) em células de medula óssea de camundongos de ambos os sexos;
3. – O larvicida biológico *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (*Bti*), não apresenta riscos potenciais para células de mamíferos em termos de mutagenicidade ou genotoxicidade, em se tratando de exposição única;
4. - Os resultados deste estudo reafirmam a necessidade de considerar os potenciais riscos, além da toxicidade aguda, que o uso esporádico, sistemático e/ou constante de inseticidas no âmbito doméstico, na agricultura e em programas de controles de vetores, pode representar à saúde humana, ao nível mutagênico ou genotóxico;

Este trabalho alerta para a importância da investigação do potencial mutagênico e/ou genotóxico de inseticidas, em geral, como medida preventiva para o uso seguro para a saúde e o meio ambiente.

9. – PERSPECTIVAS:

1. - Propor cooperação tecnológica aos órgãos de saúde/meio ambiente, para implementação de programas de monitoração biológica dos riscos de inseticidas empregados em programas de Saúde Pública;
2. - Aprofundar os conhecimentos sobre efeitos genotóxicos (clastogênicos) em mamíferos, induzidos pela exposição ao inseticida organofosforado Temefós, biolarvicida *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelenses* (*Bti*), e outros produtos que venham a ser usados no combate ao vetor da dengue. Espera-se que tais conhecimentos sejam úteis à avaliação de riscos potenciais destes produtos para a saúde humana;

CAPÍTULO X
REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

10. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, I. D. Cytogenetic test in mammals. In: VENITT, S.; PARRY, J. M. Mutagenicity testing: a practical approach Oxford: IRL, 1984. p. 257-305.
- ADVISORY COMMITTEE ON PESTICIDES. Evaluation of fully approved or provisionally approved products. Evaluation on: *Bti* (2). Pesticides Safety Directorate, Bootle, 1992.
- AIUB, C. A. et al. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide Temephos. Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto, v.1(2), p. 159-166, 2002.
- ALI, A. *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (ABG-6108) against Chironomids and some nontarget aquatic invertebrates. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 38, p. 264-272, 1981.
- AMES, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer. Science, Washington, DC, v. 304, p. 587-593, 1979.
- AMES, B. N., GOLD, L. S. Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. Mutation Research, Amsterdam, v.447, p.3-13, 2000.
- AMES, B. N.; GOLD, L. S. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. Environmental and Molecular Mutagenesis, Washington, DC, v. 14, p. 66-77, 1989.
- ANDRADE, C. F. S.; MODOLO, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var.*israelensis* in integrated control. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 184-187, 1991.
- ANWAR, W. A. Biomarkers of human exposure to pesticides. Environmental Health Perspectives, Research Triangle Park, v.105, Suppl 4, p. 801-806,1997.
- ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Biological control program against simuliids in the State of São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 90, p. 131-133, 1995.
- ASHBY, J. Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. Mutation Research, Amsterdam, v. 204, p. 51-543, 1994.
- AUGUSTO, L. G. S. et al. Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. Environmental and Molecular Mutagenesis, Washington, DC, v. 29, p. 46-52, 1997.

- AUGUSTO, L. G. S. O ambiente e o ambiente de trabalho relacionados com a prevenção e controle dos riscos ambientais específicos. In: WORKSHOP PREPARATÓRIO DA CONFERÊNCIA PAN-AMERICANA SOBRE SAÚDE, AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL 3, 1995, Rio de Janeiro (RESUMOS). Escola Nacional de Saúde Pública, 1995. Rio de Janeiro p. 17.
- BARBAZAN, P. et al. Control of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno CA, v. 13, n. 3, p. 263-269, 1997.
- BARBOSA, M. L. Dengue: revisão. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 27-45, 1996.
- BARNETT, J. B.; RODGERS, K.E. Pesticides. In: DEAN, J. H. et al. (Ed.). Immunotoxicology and Immunopharmacology, 2 ed. New York: Rave, 1994. p. 191-211.
- BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LeROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 383-396.
- BHATIA, A.; KAUR, J. Recent advances in immunomodulatory effects of some chemical pollutants: a review. International Journal of Environmental Studies, London, v. 45, p. 61-70, 1993.
- BISSAN, J. et al. Drastic reduction of populations of *Simulium sirbanum* (Diptera: Simuliidae) in central Sierra Leone after 5 years of larviciding operations by the Onchocerciasis Control Programme. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. Abgdon, v. 89, n. 1, p. 63-72, 1995.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe epidemiológico da Dengue: semanas de 1 a 6 de 2009, Brasília DF, 2009. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>> Acesso em: 18 mar 2009.
- BROWN, A. W. A. Insect control by chemicals. New York: J. Willians and sons, p. 817, 1951.
- BRUSICK, D. J. A method for combining and comparing short-term genotoxicity test date: Preface. A Report from ICPEMC Committee 1. Mutation Research, Amsterdam, v. 266, p. 1-6, 1992.
- BRUSICK, D. J. Principles of genetic toxicology. New York: Plenum, 1987.
- BRUSICK, D. J. Struture-activity relationships in mutation and cancer. Mutation Research, Amsterdam, v. 305, p. 1, 1994.

- BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. Mutação gênica. In: __ Genética. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991a. p. 14-15.
- CAIRNS, J. Somatic stem cells and kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Science the United States of America, U.S.A., v.99, p.10567-10570, 2002.
- CARANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. Mutation Research, Amsterdam, v. 204, p. 379-406, 1988.
- CAVALIERE, M. J. et al. Miotoxicidade por organofosforados. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 267-72, 1996.
- CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (Brasil). Dengue. In: GUIA brasileiro de vigilância epidemiológica. 4ed. ver. ampl. Brasília: FUNASA, CENEPI, 1998. Cap. 4, 5., p. 1-10.
- CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (Brasil). Dengue. In: GUIA brasileiro de vigilância epidemiológica. 4 ed. ver. ampl. Brasília: FUNASA, CENEPI, 2001, p. 51-54.
- CHARLES, J-F. Action de la δ endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur cultures de cellules de *Aedes aegypti* L. En microscopie electronique. Annals of Microbiology, London, v. 134A, p. 365-381. 1983.
- CHARLES, J-F. Histopatologie de l' actino de la delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur larves d'*Aedes aegypti* (Dipetra: Culicidae). Entomophaga, v. 26, p. 203-212, 1981.
- COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The sumary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Mutation Research, Amsterdam, v. 278, p. 83-98, 1992.
- COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TESTS Sex difference in the micronucleus test. Mutation Research, Amsterdam, v. 172, p. 151-163, 1986.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
- CRICKMORE, N., et al. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 131, p. 249-254, 1995.

- DE BARJAC, H. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var. *israelensis* sérotype H14. Comptes Rendus de l'Académie des sciences, Paris, v. 286, n. D, p. 797-800, 1978.
- DEFERRARI, M. et al. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes. Mutation Research, Amsterdam, v. 260, p. 105-113, 1991.
- DEGRAEVE, N.; MOUTSCHEN, J. Genetic and cytogenetic effects induced in the mouse by as ornagophosphorus inseticide: Malation. Environmental Research, New Brunswick, v. 34, p. 170-174, 1984.
- DEGRAEVE, N.; CHOLLET, M.C.; MOUTSCHEN, J. Cytogenetic and genetics effects of subchronic treatment with organophosphorus inseticides. Archives of Toxicology, New York, v. 56, p. 66-67, 1984.
- DULOUT, F. N. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. Mutation Research, Amsterdam, v. 143, p. 237-244, 1985.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA (EUA). Guidelines for mutagenicity risk assessment, Washington, DC, 1986.
- EYER, P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds: a review. Human & Experimental Toxicological. London, v. 14, p. 857-864, 1995.
- FARAH, S. B. DNA Segredos e Mistérios. São Paulo: Sarvier, 1997.
- FEDERICI, B.; LUTHY, P.; IBARRA, J. E. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: structure, protein composition, and toxicity. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. *Bacterial control of mosquitoes and blackflies*. New Jersey: Rutgers University Press, 1990. p. 16-44.
- FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronucleus in lymphocytes. Mutation Research, Amsterdam, v. 147, p. 29-36, 1984.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; CAVALCANTE, S. M. B.; SIMÕES, M. C. Encuesta serológica sobre el dengue entre escolares de Rio de Janeiro, Brasil, 1986 y 1987. Bol. Ofic. Sanit. Pan, Washington, v. 111, n. 6, p. 525-533, 1991.
- FLESSEL, P.; QUINTANA, P. J. E.; HOOPER, K. Genetic Toxicity of Malathion: a review. Environmental and Molecular Mutagenesis, Washington, v.22, p. 7-17, 1993.
- FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. São Paulo: Ed. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1965. v. 2.

- FORGET, G. Pesticides and the third world. Journal of Toxicology and Environmental Health, London, v. 32, p. 11-31, 1991.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Boletim Epidemiológico, Brasília, 1999.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Coordenação Regional de Pernambuco. Divisão de Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Relatório de Situação das Atividades de Epidemiologia, Sistema de Informação e Entomologia Relacionadas ao PEAa, no Estado de Pernambuco. Recife: DIVEP/COREPE, 2001.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Departamento de Operações. Manual de Dengue: Vigilância Epidemiológica e Atenção ao doente. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Monitoramento da Resistência das Populações de Aedes aegypti do País, Brasília, 2000.
- Gaines TB [1969]. Acute toxicity of pesticides. Toxicol Appl Pharmacol 14:515534.
- GARCIA, R.; DES ROCHERS, B.; TOZER, W. Studies on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against organisms found in association with mosquito larvae. Mosquito and Vector Control Association, Califórnia, v. 48, p. 33-36, 1980.
- GARRETT, V. Genotoxic and carcinogenic potencial of anticholinesterases. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T. (Ed.). Chemical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Oxford: Butterworth. Heinemann. 1992. p. 233-240.
- GILL, S. S., COWLES, E.A., PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 37, p. 616-636, 1992.
- GOLDBERG, L.; MARGALIT, G. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*. Mosquito News. Albany, v. 37, p. 355-358, 1977.
- GUBLER, D. J. Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. In: SCHELD, W. M.; ARMSTRONG, D.; HUGHES, J. M. (Ed.). Emerging infections 1. Washington, DC: ASM, 1997. p. 1-14.
- GUBLER, D. J. Insects in Disease Transmission. In: STRICKLAND, G. T. (Ed.). Hunter Tropical Medicine. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991q. p. 981-1000.
- GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. Emerging Infectious Diseases. Washington, v. 4, n. 3, 1998.

- GUILLET, P. et al. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for onchocerciasis control in West Africa. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. Bacterial control of mosquitoes and blackflies. New Jersey: Rutgers University, 1990. p. 187-201.
- HABIB, M.E.M., ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo: Manole, 1998. p. 383-432.
- HAYASHI, M. et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutation Research, Amsterdam, v. 312, p. 293-304, 1994.
- HEDDLE, L. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. Mutation Research, Amsterdam, v. 18, p. 187-190, 1973.
- HEDDLE, L. A. et al. The induction micronuclei as measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research, Amsterdam, v. 123, p. 61-118, 1983.
- HEMMINSKI, K. Use of chemical, biochemical, and genetic markers in cancer epidemiology and risk assessment. America Journal of Industrial Medicine, New York, v. 21, p. 65-76, 1992.
- HIRAI, O. Prior bleeding enhances the sensitivity of the *in vivo* micronucleus test. Mutation Research, Amsterdam, v. 264, p. 109-114, 1991.
- HOGSTEDT, B.; KARLSSON, A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. Mutation Research, Amsterdam, v. 156, p. 229-232, 1985.
- HOLLSTEIN, M.; MCCANN, J. Short term test for carcinogens and mutagens. Mutation Research, Amsterdam, v. 65, p. 133-226, 1979.
- HOUGARD, J. M. et al. Control of *Culex quinquefasciatus* by *Bacillus sphaericus*: results of a pilot campaign in a large area in Equatorial Africa, Bull WHO, Geneva, v. 71, p. 367-375, 1993.
- HSU, T. C.; PATTON, J. L. Bone marrow preparations for chromosome studies. In: BERNISCHKE, K. (Ed.). Comparative Mammalian Cytogenetics, New York: Springer-Verlag, 1969. p. 454-460.
- JACOBBS, M. Dengue: emergency is a global public health problem and prospect for control. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higyene, London, 2000. v. 94, p. 7-8.

- KAR, I. et al. Field evaluation of *Bacillus sphaericus*, H5a5BB. *Thurigiensis* var. *israelensis*, H-14 against the Bancroftian filariasis vector *Culex quiquefasciatus*, Say in Chennai. Indian J. Malariol, India. v. 34, p. 25-36, 1997.
- KLASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. (Ed.). In: _____. CASARETT & DOUL's: The Basic Science of Poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999 Cap. 2 -5.
- KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta, Estados Unidos, v. 924, p. 509-518, 1987.
- LAHKIM-TSROR, L. et al. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* serovar H14 in *Aedes aegypti*: histopathological studies. Journal of Invertebrate Pathology, Elsevier, v. 41, p. 104-116, 1983.
- LARINI, L. Toxicidade dos Praguicidas. In: _____. Toxicologia dos Praguicidas. São Paulo: Manole, 1999. cap. 2.
- LEGATOR, M. S.; WARD, J. B. Use of "in vivo" genetic toxicity data for risk assessment. Mutation Research, Amsterdam, v. 250, p. 457-465, 1991.
- LIEBER, R. R. Trabalho em Turnos e Riscos Químicos: O Horário de Trabalho como Fator Interveniente no Efeito Tóxico. 1991. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.
- LIJINSKI, W. A view of the relation between carcinogenesis and mutagenesis. Environmental Molecular and Mutagenesis, Washington, DC, v. 14, suppl. 16, p.78-84, 1989.
- LOEB, L. A. A mutation phenotype in cancer. Cancer Research, Baltimore v.61, p. 3230-3239, 2001.
- LOEB, L., LOEB, K. R., ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., v.100, p.776-781, 2003
- MACORIS, M. L. G. et al. Alteração da resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.
- MARDINI, L. B. L. F. et al. *Simulium* spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 211-214, 2000.
- MARDINI, L. B. L. F. et al. Field studies with the bacterial larvicide INPALBAC for *simulium* spp. Control in Rio Grande do Sul, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 679-681, 1999.

- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmoletta* mutagenicity test. Mutation Research, Amsterdam, v. 113, p. 173-215, 1983.
- MARTINS, F. S. V.; SETÚBAL, S.; CASTIÑEIRAS, T. M. P. P. Dengue. In: Doenças Infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica, 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 157-164.
- MATTER, B. E.; TSUCHIMOTO, T. Mutagenicity test system for the detection of chromosome aberrations in vivo. Archives of Toxicology, Berlin, v. 46, p. 89-98, 1980.
- MAYES, M. E. et al. Characterization of the mammalian toxicity of the crystal polypeptides of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. Toxicological Sciences, Orlando, v.13, n.2, p. 310- 322, 1989.
- MÉLO, M. E. B. Avaliação do potencial genotóxico de fármacos com ação antiparasitária através de testes de mutagenicidade em bactérias e clastogenicidade em células de mamíferos. 1996. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 1996.
- MELO, M. E. B. et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 67, n.3, p. 196-201, 2008.
- MELO, M. E. B. Evaluation of the genotoxic potential of antiparasite drugs based on bacterial mutagenicity and mammalian cell clastogenicity tests. Brazilian Journal of Genetics, Ribeirão Preto S.P, v. 20, n. 1, p. 152, 1997.
- MELO, M. E. B.; FERREIRA, L. C. S. Screening the mutagenic activities of commonly used antiparasite drugs by the Simultest, a simplified *Salmonella*/microsome plate incorporation assay. Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 32, p. 260-274, 1990.
- MOOREHEAD, P. S. et al. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. Experimental Cell Research, New York, v. 20, p. 613, 1960.
- MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A.; DARWAZEH, H. A. Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* ser. H-14 against stagnant-water mosquitoes and its effects on non target organisms. Environmental Entomology, Lanham, v. 11, p. 788-795, 1982.
- MULLIGAN, F. S.; SCHAEFER, C. H.; WILDER, W. H. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 against mosquitoes under laboratory and

- field conditions. Journal of Economic Entomology, College Park MD, v. 73, p. 684-688, 1980.
- NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. Mutation Research, Amsterdam, v.504 (1-2), p.3-16, 2002.
- NATARAJAN, A. T.; OBE, G. How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* in their ability to detect mutagens. Mutation Research, Amsterdam, v. 167, p. 189-201, 1986.
- Nobre, A. (1998). Instruções para o pessoal de Combate ao Vetor: Manual de Normas Técnicas. 2.e. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Plano Diretor de Erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil, FUNASA,
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 85, p. 253, 1990.
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. 219-225, 1989.
- OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, P. J.; NATARAJAN, A. T; MARTINEZ-LOPEZ, W.; FOLLOE, G. A.; DRETS, M.E. Chromosome aberrations: formations, identification and distribution. Mutatation. Research., Amsterdam v.504, p-3-16, 2002.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever (background of disease, transmission, history, description of the data; trends, conclusions, tables). In: ____ report on global surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases, Geneva, 2001. Disponível, em: <<http://www.who-surveillance>> Acesso em: 21 mar 2007.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. International program on chemical safety: *Bacillus thuringiensis*. Geneva, 1999. (Environmental Health Criteria, 217).
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: guias para su prefención y control, Washington, DC, 1995. (Publicación científica nº 548)
- PADILLA, S. Regulatory and research issues related to cholinesterase inhibition. Toxicology, Amsterdam, v.102, p.215-220, 1995

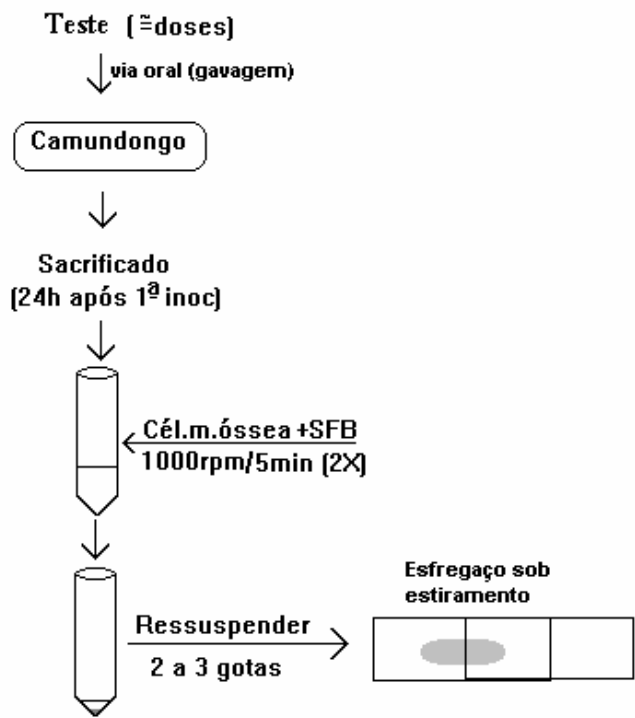
- PONCET, S. et al. Improvement of *Bacillus sphaericus* toxicity against dipteran larvae by integration, via homologous recombination of the Cry11A toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subs *israelensis*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 63, n. 11, p. 4413-4420, 1997.
- PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETO, A. Dengue em localidade urbana da Região Sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.
- PRESTON, R. J. et al. Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays. Mutation Research, Amsterdam, v. 87, p. 143-188, 1981.
- PRESTON, R. J. et al. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays; Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. Mutation Research, Amsterdam, v. 189, p. 157-165, 1987.
- PRESTON, R. J.; DEAN, B. J.; MCFEE, A. F. The *in vitro* human lymphocyte assay. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. Mutation Research, Amsterdam, v. 189, p. 157-165, 1987a.
- REGIS, L.; NIELSEN-LeROUX, C. Management of resistance to bacterial vector control. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LeROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 419-441.
- RHODAIN, F. The situation of Dengue in the world. Bull. Soc. Pathol. Exot., Paris, v. 89, n. 2, p. 87-90, 1996.
- RICHARDSON, R. J. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: A critical review of the literature. Journal of Toxicology and Environmental Health, London, v. 44, n. 2, p. 135-165, 1995.
- ROSS, D. W. Introdução à Medicina Molecular. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997.
- ROUSE, J.; JACKSON, S. P. Interfaces between the detection signaling, and repair of DNA damage. Science, Washington, v.297, p.547-551, 2002.
- RUAS-NETO, A. L. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simuliídeos no Rio Grande do Sul: susceptibilidade a campo. Boletim Saúde, Rio Grande do Sul, v. 11, n. 2, p. 21-26, 1984.
- SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Research, Amsterdam, v.544, p.99-106, 2003.

- SAVAGE, J. R. K. A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. Mutation Research, Amsterdam, v. 207, p. 33-36, 1988.
- SCHATZMAYR, H. G. Dengue situation in Brazil year 2000. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 179-181, 2000.
- SCHMID, W. The micronucleus test. Mutation Research, Amsterdam, v. 31, p. 9-15, 1975.
- SCOTT, W. T. et al. Detection of blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologique technique. Journal of Medical Entomology, Lanham, v. 30, n. 1, p. 94-99, 1993.
- Secretaria Estadual de Saúde (PERNAMBUCO). Diretoria de Epidemiologia e Vigilância Sanitária (DIEVIS). Comissão Interinstitucional de Combate à Dengue - PE (SES, FUSAM, INAMPS, FSESP, SUCAM, SMS). Dengue - Relatório de Ações da Subcomissão de Epidemiologia. Recife, 1987, 25p. PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde (SES). Diretoria de Epidemiologia e Vigilância Sanitária (DIEVIS). Estruturação do Plano de Erradicação de Aedes aegypti no Brasil (PEAa), em Pernambuco. Recife, 1997.
- SIEGEL, J. P.; SHADDUCK, J. A. Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. Bacterial control of mosquitoes and blackflies. New Jersey: Rutgers University, 1990. Cap. 12.
- SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Fundamentos de Genética. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- SPERLING, K. (Ed.). Frequency and origin of chromosome abnormalities in man. In: OBE, G. (Ed.). Mutations in Man. Berlin: Springer. Verlag, 1984. p. 128-146.
- TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 8th ed., New York: Pergamon, 1991. p. 131-149.
- TEIXEIRA, M. G. et al. Diferenças intraurbanas na circulação do vírus do dengue em uma grande cidade – Salvador/Bahia, 1998. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, Brasília, v. 32, n. 1, p. 174, 1999a.
- VASCONCELOS, P. F. C. et al. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro epidemiológico aleatório. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 447-454, 1998.

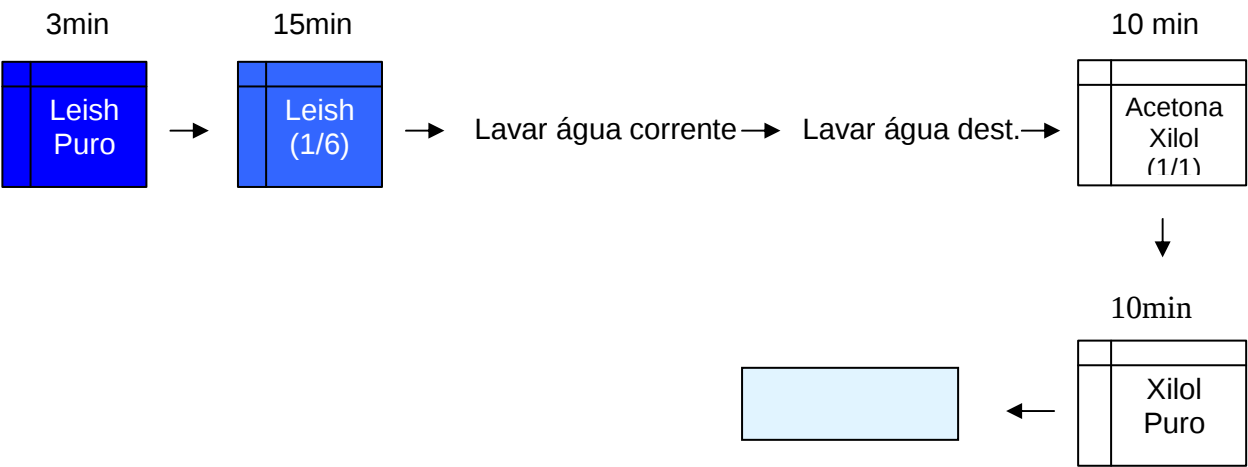
- VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inquérito soro-epidemiológico na Ilha de São Luís durante epidemia de dengue no Maranhão. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, Brasília, v. 32, n. 2, p. 171-179, 1999.
- VIJG, J.; GOSSEN, J. A. Somatic mutations and cellular aging. Comparative Biochemistry and Physiology, Oxford, v. 104B, n. 3, p. 429-437, 1993.
- VON LEDEBUR, M.; SCHMID, W. The micronucleus test. Methodological aspects. Mutation Research, Amsterdam, v. 19, p. 109-117, 1973.
- WU, D.; CHANG, F. N. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal. *FEBS Letters*, v. 190, p. 232-236. 1985.
- ZAIM, M.; GUILLET, P. Alternative inseticides: an urgent need. Trends in Parasitology, Oxford, v. 18, n. 4, p. 161-163, 2002.
- ZAMBRANO, M. A.; TARGA, H. J.; RABELLO-GAY, M. N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. Stain Technology, Baltimore, v. 57, p. 48-49, 1982.

FLUXOGRAMA - 1

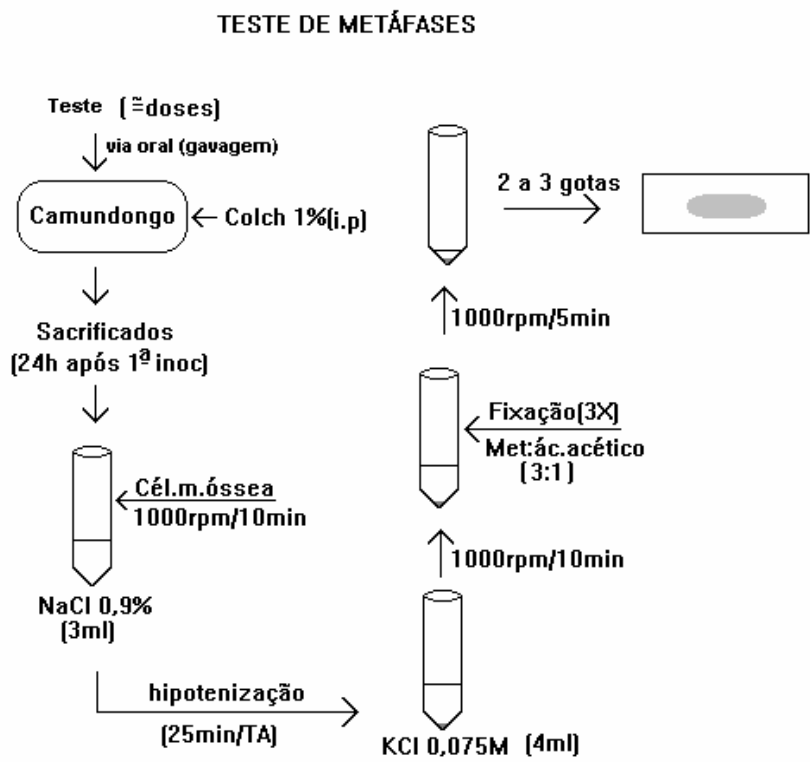
TESTE DE MICRONÚCLEOS



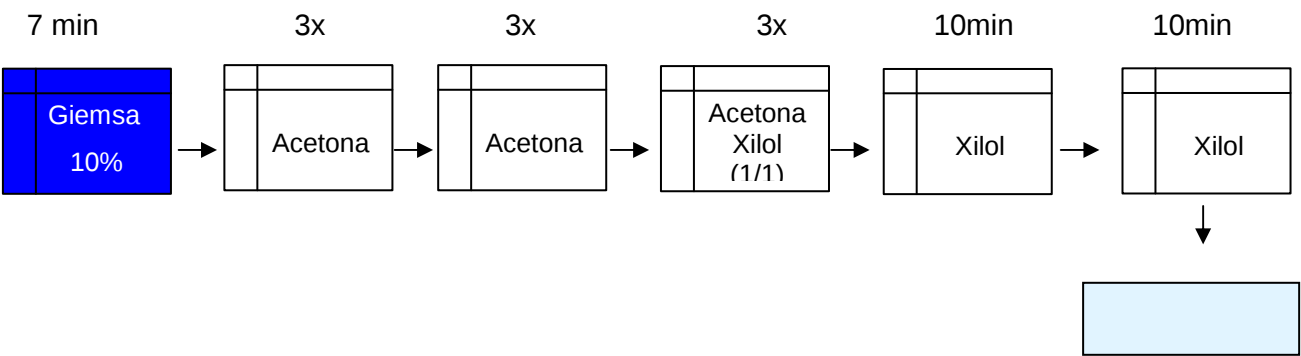
COLORAÇÃO TESTE DO MICRONÚCLEO
(Segundo Leishman)



FLUXOGRAMA - 2



COLORAÇÃO TESTE DE METÁFASES
(Segundo Giemsa)



54º Congresso Brasileiro de Genética



Sociedade Brasileira de Genética

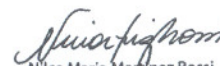
Bahia Othon Palace Hotel
Salvador - BA 16 a 19 de setembro de 2008

Certificado

A Sociedade Brasileira de Genética declara que o trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO ORGANOFOSFORADO TEMEFÓS, EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS, ATRAVÉS DO TESTE DE METÁFASE." autoria de MELO, MEB, OLIVEIRA, KP, FERNANDES, RRC, MERLO, KC, DINIZ, GTN, LUNA, CF, CATANHO, MTJA, REGIS, L, foi apresentado no 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, realizado em SALVADOR - BA, período de 16 a 19 de setembro de 2008

MU065


Horácio Schneider
Presidente da SBG


Nilce Maria Martinez Rossi
1ª Secretária da SBG





Avaliação da genotoxicidade do organofosforado temefós, em células de medula óssea de camundongos, através do teste de metáfase

Melo, MEB¹; Oliveira, KP¹; Fernandes, RRC¹; Merlo, KC¹; Diniz, GTN¹; Luna, CF¹; Catanho, MTJA²; Regis, L¹

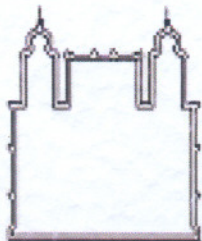
¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz - Recife PE

²Universidade Federal de Pernambuco - PE
melomeb@cpqam.fiocruz.br

Palavras-chave: genotoxicidade, temefós, teste de metáfase, aberração cromossômica, índice mitótico.

O Programa Nacional para o controle do vetor da dengue, *Aedes aegypti*, implantado pelo Ministério da Saúde em 1996, é fundamentado no uso de inseticidas químicos, principalmente o organofosforado Temefós, aplicado como larvicida nos criadouros do *Ae. aegypti*, inclusive em recipientes com água potável, resultando em extensa exposição humana. Embora algumas análises dos danos causados pelo uso destes compostos à saúde humana tenham sido feitas, elas são, em sua maioria, restritas aos efeitos agudos. A extensão destes danos no que concerne aos efeitos crônicos é pouco conhecida. Nosso objetivo foi investigar o potencial genotóxico do organofosforado Temefós grau técnico (95,5%) através do teste de metáfase, em células de medula óssea de camundongos albinos *Swiss webster*, de ambos os sexos. Os animais foram tratados (10 ml/Kg) via gavagem, com o Temefós nas concentrações de: 111,00 (DMT); 55,50 e 27,50 mg/kg e o controle negativo (água destilada) e, via i.p., com a Ciclofosfamida (CPA) 25 mg/kg, como controle positivo. O temefós induziu 72,4%; 67,2% e 47,2%, de aberrações cromossômicas (AC), segundo as doses decrescentes, em camundongos machos e 6,4%, 4,8% e 2,4% em fêmeas. Nestas, os efeitos foram significativamente menores do que os induzidos pelo CPA, que induziu 64,8% de AC em camundongos machos e 22,8% nas fêmeas. O controle negativo não induziu AC em nenhum dos testes. Os percentuais de AC induzidos pelo temefós diferiram significativamente, entre os camundongos machos e fêmeas, ao nível de 5% com efeito, dose-dependente, nos camundongos machos ($p = 0,0001$) e para os camundongos fêmeas ($p = 0,0961$). Os índices mitóticos não apresentaram para ambos os sexos, diferenças significativas entre os grupos tratados com Temefós e com CPA, diferindo, ambos, do controle negativo ($p = 0,0001$). Conclui-se que o Temefós, através da técnica empregada, induziu aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos, assim como, alteração dos índices mitóticos, interferindo, portanto na dinâmica da proliferação celular. O uso do CPA como controle positivo para detecção de genotoxicidade, assegurou a confiabilidade dos testes realizados.

Orgão financiador: CPQAM/FIOCRUZ.



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Avaliação genotóxica de compostos químicos e biológicos através de experimentos "in vivo. "

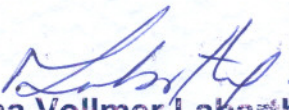
número P-465/08, proposto por Maria Eliane Bezerra de Melo, foi licenciado pelo N° L-054/08.

Sua licença de N° L-054/08 autoriza o uso anual de :

- 400 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 30 de junho de 2012.

Rio de Janeiro, 24/09/2008


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ