

Capítulo 8

Biomarcadores: Sentinelas Ambientais

Tânia M. A. D. Zucchi

Paola Poli

Michele A. de Mello

Tiago D. Zucchi

Fernando D. Zucchi

Vera L. S. S. de Castro

Resumo

Os testes para se monitorar o ambiente com eficiência, permitindo rápida intervenção para redução dos riscos genotóxicos, precisam ser rápidos, baratos e aplicáveis *in situ*. Para isto, o teste cometa (ou SCGE; cf. Singh *et alii*, 1988; Fairbain *et alii*, 1995) é um bom exemplo. O potencial para causar danos ao DNA, pode ser avaliado rapidamente e o teste cometa pode ser considerado como um biomarcador de genotoxicidade ambiental, para animais e plantas. O *background*, de tais biomarcadores, estão relacionados aos efeitos da carcinogenicidade, das alterações nas funções reprodutivas e/ou outros efeitos adversos, causados por poluentes, como pesticidas fungicidas, inseticidas, novos produtos de biotecnologia, etc. Assim, vimos estudando problemas ambientais através do desenvolvimento e melhoramento do teste cometa para vários organismos, tanto animais como vegetais, que podem ser usados para biomonitoramento no campo. Animais representam verdadeiras sentinelas para avaliação da saúde ambiental e, embora os dados obtidos com as "espécies sentinelas" não devam ser os únicos fatores determinantes na avaliação da saúde ambiental, tais dados podem ser úteis na avaliação de risco. Fornecem alarme precoce de situações que requerem atenção ou monitoramento, p. ex. de atividades biorremediadoras.

A avaliação de danos causados no DNA nuclear dos tecidos de plantas superiores, usando-se o teste cometa (CGE), é área potencialmente inovadora. Este teste pode ser incorporado àqueles testes já usados comumente em plantas para o monitoramento *in situ* da atmosfera, da água e do solo. Os objetivos deste estudo foram:

- a) estabelecer a sensibilidade do testes cometa (SCGE) em células de tecidos de roedores;
- b) ampliar o leque de aplicações do teste cometa para plantas superiores.

A literatura científica apresenta dados que indicam um efeito potencialmente co-tóxico/co-carcinogênico do fenarimol. Os primeiros resultados em leucócitos de camundongos tratados com fenarimol mostraram uma dose-resposta aos danos no DNA induzidas pelo fungicida. Nas plantas, a presença da parede celular causa algumas dificuldades técnicas para o SCGE, pois ela é uma barreira resistente à lise mesmo quando se usa tampão suficiente para degradar as células animais. Para vencer estas dificuldades os protocolos vigentes foram melhorados. Os novos protocolos foram aplicados aos tecidos de cultivares (Bel B e BelW3) de *Impatiens balsamina* e de *Nicotiana tabacum*, com diferentes sensibilidades ao ozônio, que vem sendo muito usado nos últimos 30 anos. Sistemas vegetais representam um meio multicelular complexo onde, a eficiência dos diferentes mecanismos de proteção ou reparo, pode ser modulada pela homeostasia celular. Entretanto, a capacidade de resposta dos sistemas biológicos contra poluentes genotóxicos, pode contrabalançar com a provável perda de sensibilidade, contra compostos portadores de radicais livres.

Em todos os sistemas analisados, os primeiros resultados mostraram danos significativos ao DNA, induzidos por peróxido de hidrogênio, porém, a sensibilidade de *I. balsamina* e Bel W3 é maior.

8.1 Introdução

O estabelecimento de novos testes do tipo *short-term*, rápidos, baratos e aplicáveis *in situ* como detectores de agentes mutagênicos ambientais permitem o seu amplo emprego num monitoramento mais eficiente. Isso permite uma rápida intervenção com eventual sucesso na redução de riscos genotóxicos para o ambiente e para o homem.

A medida das quebras das fitas de DNA feitas através de eletroforese Microgel (MGE), ou *Single Cell Gel Assay* (SCG), ou teste cometa, pode avaliar a eficiência dos agentes genotóxicos ambientais. O teste Cometa é um método sensível e rápido para a detecção de quebras nas fitas de DNA, em células individualizadas. Seu uso tem aumentado significativamente nos últimos anos (Singh *et alii*, 1988; Fairbairn *et alii*, 1995). Poucas células suspensas em uma fina camada de gel agarose numa lâmina de microscópio são lisadas, eletroforizadas e coradas com um corante fluorescente que se liga ao DNA. A corrente elétrica empurra o DNA para fora do núcleo de tal modo que o DNA relaxado e quebrado migra na frente. As imagens resultantes, que pela aparência são denominadas de "cometa", são avaliadas para se determinar a extensão dos danos ao DNA. O Método para a medida da quebras na fita do DNA geralmente é baseado no princípio de que agentes que quebram o DNA, reduzem bastante o tamanho da molécula.

Além disso, quebras em DNA simples fita podem ter efeitos dramáticos sobre a estrutura da cromatina altamente compactada e fortemente enovelada dentro do núcleo. Para uma detecção mais exata, os experimentos que medem as quebras do DNA simples fita, precisam do desenrolamento da molécula de DNA dupla fita. pH alto (>12) é usado para facilitar a denaturação, o desenrolamento e a expressão das quebras do DNA, simples e dupla fita, pois as quebras só se tornam aparentes depois da exposição a álcalis (lesões álcali lábeis).

Efeitos mutagênicos resultantes dos danos ao DNA são as seqüelas *long-term* da genotoxicidade. Agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente como tendo a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética.

O principal foco dos testes *short-term* de genotoxicidade incluem danos no DNA, mutações de ponto, aberrações cromossômicas, etc. (Combes, 1992). A impressionante sensibilidade do teste cometa e a sua habilidade de fornecer a estimativa dos danos no DNA, em células individuais, tornaram esta metodologia um instrumento que permite rápida avaliação do teor de genotoxicidade das substâncias, permitindo-se prevenir eventuais efeitos deletérios.

Desse modo, as aplicações afins estão se expandindo tão rapidamente quanto progride a nossa capacidade de compreender sua atuação e improvisar o seu uso. Argumenta-se se o sistema fornece

informações a respeito da genotoxicidade ou da habilidade de um composto alterar o reparo do DNA, o que poderia ser tão prejudicial quanto a indução direta do dano. A aplicação do teste virtualmente a todos os tipos de células eucarióticas, explica a rápida e crescente disseminação do seu uso. Além disso, o desenvolvimento de sistemas de células humanas para pesquisas vêm acrescentando interesse incomum e especial importância à utilidade do teste.

Além disso, quando pode-se obter suspensões de células, de um dado tecido, os danos causados no DNA por certos agentes podem ser medidos diretamente (De Meo *et alii*, 1991; Pool-Zobel *et alii*, 1992; Pool-Zobel *et alii*, 1993; Betti *et alii*, 1993).

Os programas complexos que promovem carcinogênese via agentes genotóxicos e mutagênicos, provavelmente, incluem iniciação, promoção e conversão maligna. A avaliação dessas etapas pode ser feita pela aplicação do teste cometa. Nesses casos, como *short-term test* para genotoxicidade e em comparação com os outros testes mais usados em situações afins (determinação de aberrações cromossômicas e de micronúcleos), ele é o ideal. De fato, quanto à sua atuação em sistemas de células, suas características favoráveis são: sensibilidade aumentada, maior flexibilidade na detecção dos danos ao DNA e rápida detecção dos danos imediatamente após a injúria ao DNA, sem qualquer necessidade de se esperar pela progressão das mitoses. Entretanto, a principal limitação para a aplicação desta técnica a todas as células eucarióticas, sem exceção, prende-se ao fato de que tecidos sólidos necessitam de tratamento prévio para liberar células individuais.

O potencial de danos ao DNA, mensuráveis pelo teste cometa, é considerável. Desse modo, é inegável que o SCGE pode servir, *in vivo* e *in vitro*, para o biomonitoramento da toxicidade induzida por poluentes ambientais, tanto em animais como em plantas (Fairbairn *et alii*, 1994; Calderón-Garcidueñas *et alii*, 1997; Malyapa *et alii*, 1997a,b; Mitchelmore e Chipman, 1998; Wilson *et alii*, 1998; Cotelle e Ferard, 1999; Gluck e Gebbers, 2000; Kassie *et alii*, 2000; Moller *et alii*, 2000).

Assim, este trabalho abrange um estudo da aplicação e do melhoramento do teste cometa, em alguns organismos que podem ser usados como biomonitores no campo. Uma ênfase maior é dada aos poluentes empregados na agricultura (pesticidas, fungicidas, inseticidas).

Os animais representam verdadeiras sentinelas para a avaliação da saúde ambiental. Por exemplo, muitos estudos têm sugerido uma correlação entre neoplasia em organismos aquáticos e níveis de poluição (Mix, 1986; Moore e Myers, 1994); por outro lado, diferentes espécies de vertebrados e invertebrados têm sido usados para se detectar compostos genotóxicos no ambiente (Ralph e Petras, 1998; Steinert *et alii*, 1998). Mais recentemente, um *workshop* denominado *Using sentinel species data to address the potential human health effects of chemicals in the environment* foi organizado com a intenção de se considerar o uso de sentinelas para se avaliar o potencial de risco dos poluentes ambientais sobre a saúde humana (Van der Schalie *et alii*, 1999). Embora, seja provável que dados de espécies sentinelas serão usados como os únicos fatores determinantes da preocupação na avaliação da saúde humana, tais dados podem ser úteis como um peso adicional de evidências para o estabelecimento do risco, uma vez que fornecem alarme precoce de situações que requerem estudos posteriores, visando monitoramento que poderão dar curso a atividades de bioremediação. Evidentemente, isso poderá surgir das observações em animais tanto em seus ambientes naturais como situações laboratoriais. Para uma avaliação mais precisa de saúde ambiental é particularmente atraente o uso de material vegetal (Fomin & Hafner, 1998; Monarca *et alii*, 1998). Além disso, foi demonstrada uma boa correlação entre os dados de bioanálises com plantas e aqueles de sistemas de mamíferos. Ademais, plantas superiores permitem monitorar todo um ecossistema e disso pode-se seguir a evolução do impacto genotóxico. A medida do dano ao DNA nuclear em tecidos de plantas superiores é uma área nova de estudos com SCGE (Koppen & Verschaeve, 1996; Navarrete *et alii*, 1997; Gichner & Plewa, 1998; Koppen & Angelis, 1998; Poli *et alii*, 1999a,b; Angelis *et alii*, 2000; Gichner *et alii*, 2000a,b; Menke *et alii*, 2000), pois o teste poderia ser incorporado às plantas para monitorar *in situ* a atmosfera, a água e o solo. Entretanto, a presença da parede celular causa dificuldades técnicas à aplicação do SCGE, pois ela representa uma barreira resistente à lise celular mesmo quando se usa um tampão de lise suficiente para degradar células animais.

Os principais objetivos deste estudo foram:

- a) adequar o teste cometa para ser aplicado às plantas superiores;
- b) para estabelecer a sensibilidade do teste cometa em células de mamíferos tratadas com xenobióticos.

Desse modo, um teste cometa revisado foi aplicado a tecidos de *Impatiens balsamina*, espécie de plantas selvagens, comum no Brasil, e a dois cultivares de *Nicotiana tabacum* com diferentes sensibilidades ao ozônio (O_3 -tolerante cv Bel-B e O_3 -sensível cv Bel-W3), amplamente usadas nos últimos 30 anos para avaliar danos ao DNA induzidos por agentes oxidantes (Heggstad,1991).

A sensibilidade de células de mamíferos foi determinada em leucócitos de camundongos tratados com fenarimol, um fungicida muito usado com possível potencial co-tóxico/co-carcinogênico e promotor (Paolini *et alii*, 1996a,b; Lodovici *et alii*, 1997; Vinggaard *et alii*, 1999; 2000).

8.2 Material e Métodos

8.2.1 Produtos químicos

Reagentes para eletroforese, agarose com ponto de fusão normal (NMA) e com ponto de fusão baixo (LMA); meio para crescimento de plantas (cat. # MSS19) e químicos gerais da Sigma e fenarimol.

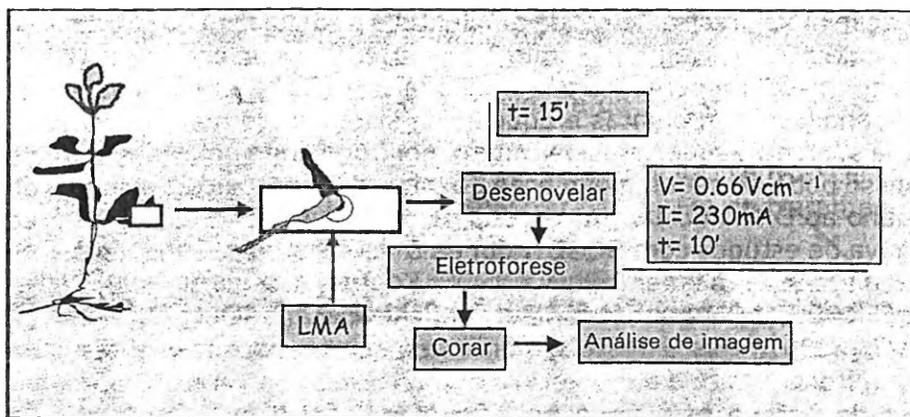


Figura 8.1 - Teste cometa em células de plantas.

8.2.2 SCGE de plantas

8.2.2.1 Sementes de plantas

Impatiens balsamina, sementes comumente comercializadas; *Nicotiana tabacum*, cultivares Bel B e Bel W3 (Heggstad,1991), cortesia do Prof. G. Lorenzini, Universidade de Pisa (Itália).

8.2.2.2 Condições de crescimento das plantas

Germinação de sementes em potes de plástico ($\varnothing = 10$ cm) contendo vermiculita e irrigadas com água filtrada. Depois da germinação, as plântulas são transferidas para novos potes de plástico (três plântulas/pote). Durante a germinação e crescimento, elas são irrigadas com meio MSS19 diluído (1/10). Mudanças intactas (com cerca de 45 dias, desde a germinação) foram usadas para o experimento.

8.2.2.3 *Plant treatments*

As plântulas foram removidas dos potes e a vermiculita foi retirada das raízes por diversas lavagens com água de torneira. As raízes das plântulas inteiras foram mergulhadas em tubos *Eppendorf* contendo 1 ml de concentração adequada de H_2O_2 em água destilada e incubadas por 20 minutos sob luz natural.

Single Cell Gel Eletroforese (SCGE)

Lâminas desengorduradas são mergulhadas previamente em 1% NMA, para a primeira camada de gel. Amostras de folhas são cortadas e vários pedaços são mergulhados diretamente em uma gota (dez vezes o tamanho do pedaço) de LMA (0,5% in PBS) permanecendo no topo da primeira camada de agarose. Durante esta fase, as lâminas são colocadas e mantidas em uma superfície aquecida (37 °C). Finalmente LMA foi adicionado como uma camada superior de agarose. As modificações descritas do método resultaram num aumento do campo de núcleos e numa distribuição uniforme de núcleos na camada de agarose. As lâminas são mantidas a 4 °C na solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10) toda à noite (no escuro).

O DNA é relaxado por 15 minutos em um tampão alcalino de eletroforese (1 mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH, pH ≥ 13) e submetido à eletroforese no mesmo tampão por 10' a $0,66$ Vcm⁻¹ e 230 mA.

Concluída a eletroforese, as lâminas são lavadas em tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5). Para a obtenção de amostras permanentes, as lâminas devem ser drenadas, expostas rapidamente a etanol (95%) gelado e colocadas para secar a temperatura ambiente.

Imediatamente antes do exame do DNA, o material é corado com 100 μL de brometo de etídio (2 $\mu\text{L}/\text{ml}$). As amostras são examinadas em microscópio de fluorescência (Leitz Dialux 20), equipado com um filtro de excitação BP 515-560 nm e um filtro de barreira LP 580 nm.

8.2.3 SCGE de células de mamíferos

Single Cell Gel Electrophoresis

Eritrócitos íntegros de camundongos machos são centrifugados e mantidos por 10 minutos em uma solução de lise (*erylyse*) para isolamento dos leucócitos (155 mM NH_4Cl , 5 mM KHCO_3 , 0,005 mM Na_2EDTA , pH 7,4) Segue-se lavagem a 37 °C, com PBS e ressuspensão ($\sim 10^6$ cell/ml) em PBS. Meio contendo células e volumes apropriados de fenarimol (cinco doses: 0, 1, 2, 3, 4 mg/ml) são adicionados a um tubo *Eppendorf*. Os tratamentos seguem-se por 1 hora a 37 °C. Para SCGE as alíquotas são usadas, basicamente do mesmo modo de acordo com Singh *et alii* (1988). Para a primeira camada, lâminas desengorduradas são mergulhadas em 1% *Normal Melting Agarose*. Após isso as células ($\sim 2 \cdot 10^5$ células) são misturadas com *Low Melting Agarose* (LMA) e espalhadas sobre a primeira camada. Finalmente LMA é adicionado como camada superior. As células são lisadas e mantidas por uma noite a 4 °C, no escuro (2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10). O DNA é relaxado e desenrolado por 20 minutos em um tampão alcalino de eletroforese, recém-preparado (1 mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH, pH 13) e submetido à eletroforese no mesmo tampão por 20 minutos a 0,78Vcm⁻¹ e 300 mA.

Os passos subseqüentes são executados do mesmo modo como na SCGE de plantas.

8.3 Resultados e Discussão

8.3.1 Avaliação dos danos de DNA

8.3.1.1 Células de mamíferos

Fenarimol foi usado para tratamento de leucócitos de camundongos. Este fungicida é considerado como fraco ou não genotóxico.

Depois do tratamento células de roedores mostraram uma dose-resposta na indução de danos no DNA. Todas as amostras tratadas mostraram uma frequência de distribuição estatisticamente diferente com relação a dose 0 (Dunnett's C, $P < 0,01$). Células *Ghost* só são detectadas nas doses mais altas (cerca de 2%).

8.3.1.2 Células de plantas

Para se verificar se a alta sensibilidade do cultivar Bel W3 resulta de uma aumentada sensibilidade aos agentes oxidantes, as plântulas foram tratadas com H_2O_2 depois de exposição ao ozônio e ao estresse ambiental. O peróxido de hidrogênio é capaz de induzir danos já detectados pela análise de SCGE (teste cometa). Um aumento significativo (Dunnett's C, $P < 0,001$, tratado vs. controle) de danos no DNA foi detectado em todos sistemas de plantas testados (*I. balsamina* e *N. tabacum*, Bel B e Bel W3 cultivares) depois do tratamento com 100 mM H_2O_2 . Células *Ghost* não foram detectadas. Os dados preliminares relatando os efeitos da H_2O_2 em danificar o DNA em *I. balsamina* e *N. tabacum* Bel B e BelW3 concordam com a hipótese de que alguns componentes da maquinária que protege a integridade do DNA do estresse oxidativo pode ocorrer no cv. Bel W3. Os danos induzidos por H_2O_2 são significativamente maiores no Bel W3 quando comparados com aqueles observados no cv. Bel B enquanto que *I. balsamina* mostra uma sensibilidade comparável. A concentração da H_2O_2 usada neste experimento é bastante alta, mas sabe-se que as plantas são dotadas de eficiente para decomposição da H_2O_2 . Com relação a isto, nós acreditamos que o uso de mutantes ou de plantas transgênicas (*knocked-out*), que são defectivas em um ou mais componentes da maquinária de decomposição ou de reparo do DNA poderiam aumentar a sensibilidade do teste cometa. As frequências de núcleos redondos, núcleos com caudas de pequeno tamanho, núcleos com caudas de tamanho médio, e núcleos com caudas longas, são determinadas (figura 8.2). Os núcleos são classificados em: não danificados (*i.e.*, sem migração), com migração curta, com migração média, com migração longa e com migração completa (*i.e.*, nenhum núcleo remanescente). A porcentagem de quatro classes de danos no DNA (*i.e.*, classe 1 = sem danos, classe 2 = baixos danos, classe 3 = danos médios, classe 4 = danos altos) são calculadas e suas frequências registradas. Células com completa migração de DNA são definidas como células "fantasmas" (figura 8.3). Estas não são usadas nos cálculos estatísticos dos dados e são relatadas separadamente. Teste não paramétrico (Spearman teste) foi usado para comparação das doses.

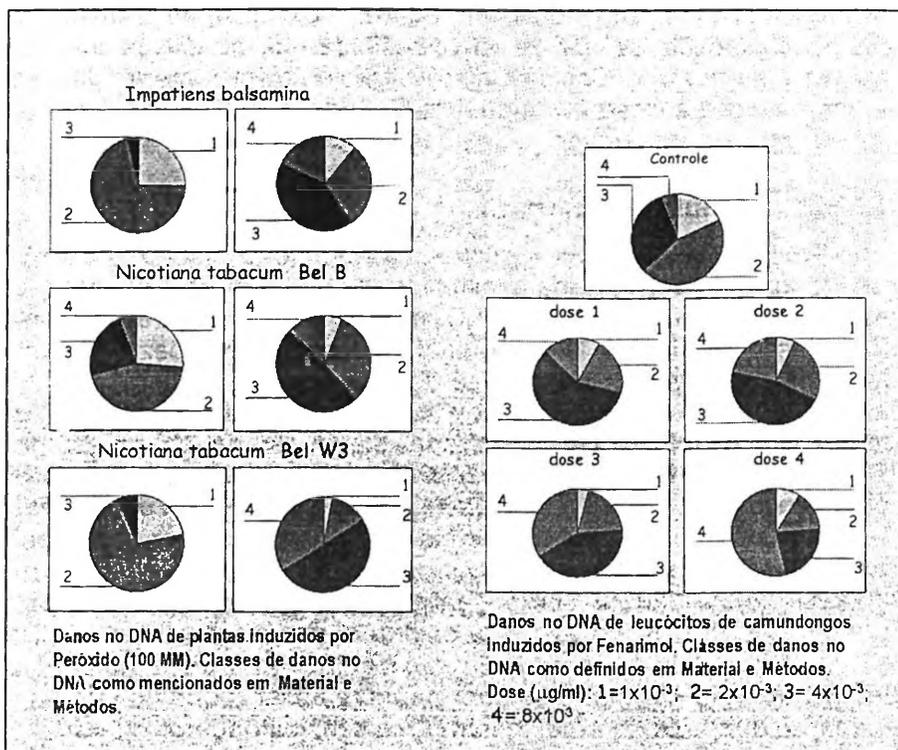


Figura 8.2 – Danos induzidos no DNA de células de plantas e de mamíferos.

Nosso protocolo modificado do teste cometa foi aplicado a todos tecidos (das raízes às partes epigeas) para verificar se SCGE de plantas poderia ser um instrumento adequado para monitoramento dos danos primários do DNA induzidos por poluentes, *in situ*. Os dados preliminares sugeriram que a aplicação do teste cometa para os tecidos epigeas das plantas superiores, poderia ser útil também na estimativa da biodisponibilidade e dos danos genotóxicos causados por poluentes do ar, incluindo compostos voláteis. Plantas superiores têm larga tradição no uso em pesquisa de mutação e a inclusão do SCGE em sistemas de plantas (raízes e tecidos epigeas) poderiam ampliar sua utilização, desta feita, na mutagênese ambiental, tanto *in vitro* como *in situ*.

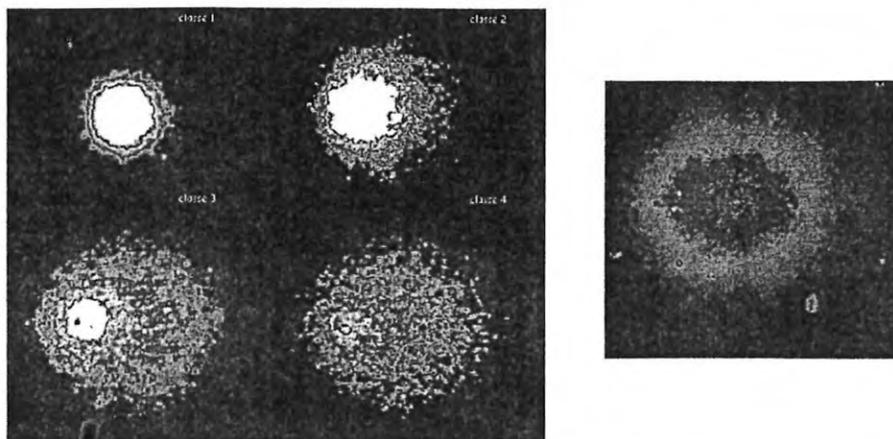


Figura 8.3 – Classes de danos no DNA.

8.4 Referências

- ANGELIS, K. J.; MCGUFFIE, M.; MENKE, M. & SCHUBERT, I. Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the comet assay. **Environ. Mol. Mutagen.**, 36:146-150. 2000.
- BETTI C.; BARALE, R. & POOL-ZOBEL, B. L. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. **Env. Mol. Mutagen.**, 22:172-180. 1993.
- CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L.; OSNAYA, N.; RODRÍGUEZ-ALCARAZ, A. & VILLARREAL-CALDERÓN, A. DNA damage in nasal respiratory epithelium from children exposed to urban pollution. **Environ. Mol. Mutagen.**, 30:11-20. 1997.
- COMBES, R. D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chem. Indust.** 24:950-954. 1992.
- COTELLE, S. & FERARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environ. Mol. Mutagen.**, 34:246-255. 1999.
- DE MEO; LAGET, M.; CASTEGNARO, M. & DUMENIL, G. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. **Mutat. Res.**, 260:295-306. 1991.

- FAIRBAIRN, D.; MEYERS, D. & O'NEILL, K. Detection of DNA damaging agents in environmental water samples. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 52:687-690. 1994.
- FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L. & O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, 339:37-59. 1995.
- FOMIN, A. & HAFNER, C. Evaluation of genotoxicity of emission from municipal waste incinerators with Tradescantia-micronucleus bioassay. **Mutat. Res.**, 414:139-148. 1998.
- GICHNER, T.; MENKE, M.; STAVREVA, D. A. & SCHUBERT, I. Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the comet assay in tobacco and field beans. **Mutagenesis**, 15:385-389. 200a.
- GICHNER, T. & PLEWA, M. J. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. **Mutat. Res.**, 401:143-152. 1998.
- GICHNER, T.; PTACEK, O.; STAVREVA, D. A.; WAGNER, E. D. & PLEWA M. J. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. **Mutat. Res.**, 470:1-9. 2000b.
- GLUCK, U. & GEBBERS, J. O. The comet assay of nasal epithelia: measurement of DNA damage for the assessment of genotoxic air pollution. **Laryngoscope**, 110:123-125. 2000.
- HEGGESTAD, H. E. Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. **Environ. Pollut.**, 74:264-291. 1991.
- KASSIE, F.; PARZEFALL, W. & KNASMULLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. **Mutat. Res.**, 463:13-31. 2000.
- KOPPEN, G. & VERSCHAEVE, L. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA breaks in *Vicia faba* root cells. **Mutat. Res.**; 360:193-200. 1996.
- KOPPEN, G. & ANGELIS, K. J. Repair of X-ray induced DNA damage measured by the Comet Assay in roots of *Vicia faba*. **Environ. Mol. Mutagen.**, 32, 281-285. 1998.
- LODOVICI, M.; CASALINI, C.; BRIANI, C. & DOLARA, P. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. **Toxicology**, 117:55-60. 1997.
- MALYAPA, R. S.; ABERN, E. W.; STRAUBE, W. L.; MOROS, E. G.; PICKORD, W. F. & ROTI ROTI, J. L. Measurement of DNA damage after exposure to 2450MHz electromagnetic radiation. **Radiat. Res.**, 148, 608-617. 1997a.
- MALYAPA, R. S.; ABERN, E. W.; STRAUBE, W. L.; MOROS, E. G.; PICKORD, W. F. & ROTI ROTI, J. L. Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication 1997b.frequency band (835.62 and 847.74MHz). **Radiat. Res.**, 148, 618-627.

- MENKE, M.; MEISTER, A. & SCHUBERT, I. N-Methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage detected by the comet assay in *Vicia faba* nuclei during all interphase stages is not restricted to chromatid aberration hot spots. **Mutagenesis**, 15:503-506. 2000.
- MITCHELORE, C. L. & CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutat. Res.**, 399, 135-147. 1998.
- MIX, M. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical literature review. **Mar. Environ. Res.**, 20:1-141. 1986.
- MOLLER, P.; KNUDSEN, L. E.; LOFT, S. & WALLIN, H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 9:1005-1015. 2000.
- MONARCA, S.; ZANARDINI, A.; FERRETTI, D.; FALISTOCCO, E.; ANTONELLI, P.; RESOLA, S.; MORETTI, M.; VILLARINI, M. & NARDI, G. Mutagenicity and clastogenicity of gas stove emissions in bacterial and plant tests. **Environ. Mol. Mutag.**, 31:402-408. 1998.
- MOORE, M. J. & MYERS, M. S. Pathobiology of chemical-associated neoplasia in fish. In Malins D.C., Ostrander G.K. (eds.). "Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspective". **CRC Press**, Boca Raton, FL, 327-386. 1994.
- NAVARRETE, M. H.; CARRERA, P.; DE MIGUEL, M. & DE LA TORRE, C. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutat. Res.**, 389:271-277. 1997.
- PAOLINI, M.; MESIRCA, R.; POZZETTI, L.; MAFFEI, F.; VIGAGNI, F.; HRELIA, P. & CANTELLI-FORTI, G. (1996a) Genetic and non-genetic biomarkers related to carcinogenesis in evaluating toxicological risk from Fenarimol. **Mutat. Res.**, 368:27-39. 1996a.
- PAOLINI, M.; MESIRCA, R.; POZZETTI, L.; SAPONE, A. & CANTELLI-FORTI, G. Molecular non-genetic biomarkers related to Fenarimol cocarcinogenesis: organ- and sex-specific CYP induction in rat. **Cancer Lett.**, 101:171-178. 1996b.
- POLI, P.; BUSCHINI, A.; FICARELLI, A.; RESTIVO, F. M.; ZUCCHI, T. M. A. D. & ROSSI, C. The Comet Assay applied to microorganisms and plants. Methods and problems. **Neoplasma**, 46S:74-75. 1999a.
- POLI, P.; BUSCHINI, A.; RESTIVO, F. M.; FICARELLI, A.; CASSONI, F.; FERRERO, I. & ROSOSI, C. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. **Mutagenesis**, 14:547-555. 1996b.
- POOL-ZOBEL, B. L.; GUIGAS, C.; KLEIN, R. G.; NEUDECKER, C.; RENNER, H. W. & SCHMEZER, P. Assessment of genotoxic effects by lindane. **Food Chem. Tox.**, 31:271-283. 1993.

- POOL-ZOBEL, B. L.; LAMBERTZ, R.; KNOLL, M. & SCHMEZER, P. Detection of genotoxicity in cells of the gastrointestinal tract. **Mutagenesis**, 7:166-172. 1992.
- RALPH, S. & PETRAS, M. Caged amphibian tadpoles and *in situ* genotoxicity monitoring of aquatic environment with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Mutat. Res.**, 413:235-250. 1998.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. & SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, 175, 184-191. 1988.
- STEINERT, S. A.; STREIB-MONTEE, R.; LEATHER, J. M. & CHADWICK D. B. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutat. Res.**, 399: 65-85. 1998.
- VAN DER SCHALIE, W. H.; GARDNER, H. S. Jr.; BANTLE, J. A.; DE ROSA, C. T.; FINCH, R. A.; REIF, J. S.; REUTER, R. H.; BACKER, L. C.; BURGER J.; FOLMAR, L. C. & STOKES, W. S. Animals as sentinel of human health hazards of environmental chemicals. **Environ. Health Perspect.**, 107:309-315. 1999.
- VINGGAARD, A. M.; BREINHOLT, V. & LARSEN, J. C. Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation *in vitro*. **Food Addit. Cor-tam.**, 16:533-542. 1999.
- VINGGAARD, A. M.; HNIDA, C.; BREINHOLT, V. & LARSEN J. C. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in vitro*. **Toxico!**. *In Vitro*, 14:227-234. 2000.
- WILSON, J. T.; PASCOE, P. L.; PERRY, J. M. & DIXON, D. R. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). **Mutat. Res.**, 399, 87-95. 1998.