



SETAC – Brazil

## O Ensaio Cometa na Avaliação da Genotoxicidade Induzida por Poluentes Atmosféricos Utilizando como Biomonitor o Molusco *Cantareus aspersus* (Müller, 1774)

J. DA SILVA,<sup>1\*</sup> N. SIMEONI,<sup>1</sup> A. A. GROFF,<sup>1</sup> M. IANISTCKI,<sup>1</sup> V. BENVEGNÚ<sup>1</sup> & N. T. SCHRÖDER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Toxicológica, PPGTA, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS

<sup>2</sup>Laboratório de Poluição Ambiental, PPGEAM, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS

(Received August 16, 2006; Accepted December 18, 2006)

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do uso do molusco terrestre *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) como biomonitor e a metodologia do Ensaio Cometa como biomarcadora de dano genético, por meio da exposição dos organismos a poluentes atmosféricos da área estudada. Os moluscos foram expostos às condições atmosféricas na estação de climatologia do Campus da Ulbra, Canoas (RS), por 7, 15 e 30 dias em duas estações: inverno de 2004 e verão de 2005. O grupo-controle não foi exposto, permanecendo no laboratório sob condições controladas. Células de pulmão e hemolinfa foram analisadas por meio do Ensaio Cometa, um teste rápido e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA. Foram analisadas 100 células/indivíduo/tecido e classificadas visualmente em cinco classes: sem danos – classe 0; até danos máximos – classe 4. Os resultados mostraram que as células pulmonares são mais sensíveis que as células da hemolinfa. Quanto maior o tempo de exposição, mais danos ao DNA eram causados. Em relação às estações do ano, verificaram-se níveis de danos maiores que os controles de forma significativa, porém sem grandes diferenças entre as estações. O organismo e o método utilizado mostraram-se baratos, efetivos e sensíveis no estudo envolvendo biomonitoramento de organismos expostos aos diversos poluentes atmosféricos.

*Palavras-chave:* biomonitoramento, Ensaio Cometa, *Cantareus aspersus*, poluição atmosférica.

### ABSTRACT

#### **Evaluation of genotoxicity induced by atmospheric pollution using the land mollusk *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) as biomonitor and the Comet Assay as biomarker**

The objective of this work was to investigate the viability of using the land mollusk *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) as biomonitor and the Comet Assay as biomarker, exposing organisms to atmospheric pollutants. Organisms were exposed to air at the Ulbra University campus climatic control station (Canoas, RS) for 7, 15 and 30 days, in the winter/2004 and in the summer/2005. Our control group, not exposed, was kept in the laboratory, under controlled conditions. Lung cells and hemolymph cells were evaluated through Comet Assay, which shows sensitive results in a short time in quantifying lesions and detecting DNA repair effects. 100 cells/individual/tissue were analyzed and visually classified into five classes (0 – no effect to 4 – maximum damage). Results show that pulmonary cells are more sensitive than hemolymph cells. Longer exposition time produced more DNA damage. Considering climatic seasons, no significant differences were detected between them. Both organisms and method showed to be cheap, effective and sensitive in our study, for biomonitoring atmospheric pollution.

*Key words:* biomonitoring, Comet Assay, *Cantareus aspersus*, atmospheric pollution.

\*Corresponding author: Juliana da Silva, e-mail: juliana.silva@ulbra.br.

## INTRODUÇÃO

A emissão de gases tóxicos e de material particulado na atmosfera tem crescido em quase todas as grandes aglomerações urbanas e industriais do mundo, afetando não só a qualidade local do ar, mas produzindo efeitos que se manifestam a grandes distâncias e a longo prazo. Os ventos podem transportar os poluentes para longe, submetendo novas áreas a chuvas ácidas que causam danos à vegetação e contaminam o solo.

Veículos e indústrias são dois dos maiores fornecedores de agentes da poluição. Chaminés despejam, sem parar, toneladas de enxofre, óxido de nitrogênio, ácido sulfúrico, dióxido de enxofre, ácido fluorídrico, hexacloreto de benzeno, sulfeto de carbono, cloro, fenóis e outras substâncias nocivas (Freire, 2000).

A exposição às emissões provenientes dos motores dos veículos tem sido considerada preocupante pelos seus efeitos na saúde humana em longo prazo. Nas cidades, os automóveis são responsáveis por considerável parcela da poluição do ar (cerca de 80%), já que os gases produzidos pelos motores, via explosão, contêm diversos poluentes sabidamente genotóxicos, como: óxidos de nitrogênio (NO e NO<sub>2</sub>) (Victorin, 1994) e monóxido de carbono, derivados oxigenados dos hidrocarbonetos, como aldeídos e peróxidos, partículas residuais da combustão, além de chumbo, até a pouco adicionado como antidetonante à gasolina. Todos esses compostos isolados ou associados a outros elementos são tóxicos ou de efeito danoso aos organismos, de forma não totalmente esclarecida. Traços de outras substâncias perigosas, como cádmio e níquel, também são encontrados. O vento e as chuvas provocam a precipitação desses elementos, contaminando as águas e o solo e colocando em risco a vida humana e o meio ambiente por terem efeito cumulativo. A EPA (Environmental Protection Agency – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) atribui a essas substâncias tóxicas emitidas pelos carros a metade dos casos de câncer causados por substâncias presentes no ar. Alguns estudos experimentais e evidências epidemiológicas indicam que a gasolina e o óleo diesel têm efeito mutagênico e/ou carcinogênico em animais e no homem (Crebelli *et al.*, 1995).

As emissões do tráfego são as principais fontes da poluição do ar das regiões urbanas (Mage *et al.*, 1996). A cidade de Canoas, além de possuir tráfego intenso, tanto nas rodovias que a cortam como nas principais avenidas, também recebe as emissões de indústrias localizadas em sua região metropolitana. Apesar disso, a poluição em sua atmosfera ainda não foi devidamente caracterizada e não há controles sistemáticos da poluição existente. Por isso é necessário que se ponha em prática projetos de monitoramento da qualidade do ar e dos efeitos que os poluentes têm sobre os seres vivos expostos, incluindo testes de genotoxicidade e monitoramento de populações humanas para conhecimento e prevenção de doenças públicas e ocupacionais que afetam grande parte da sociedade atual. Para este estudo escolheu-se *Cantareus aspersus* como organismo biomonitor por ser bastante resistente,

possuir aclimação fácil e ainda não ter sido descrito o Ensaio Cometa para moluscos terrestres em avaliação ecotoxicológica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de estudo

Tendo em vista os objetivos traçados, o local utilizado para exposição dos organismos à poluição atmosférica foi a estação de climatologia do campus Universidade Luterana do Brasil – Ulbra, Canoas, RS.

### Dados ambientais

Os dados ambientais quanto à temperatura e à umidade relativa do ar tanto no inverno (2004) como no verão (2005) foram obtidos na Ulbra, na estação de climatologia. Já os índices de qualidade do ar (IQA<sub>r</sub>) foram obtidos no site FEPAM-RS (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler; disponível em: [www.fepam.rs.gov.br](http://www.fepam.rs.gov.br)). O IQA<sub>r</sub> tem por objetivo entender a qualidade do ar local em relação a diversos poluentes atmosféricos amostrados nas estações de monitoramento. O IQA<sub>r</sub> proposto pela FEPAM é obtido por meio de uma função linear segmentada, na qual os pontos de inflexão representam os Padrões Nacionais de Qualidade do Ar e os critérios para episódios agudos da poluição do ar estabelecidos conforme a Resolução CONAMA nº 03 de 28/06/1990, para seis poluentes atmosféricos: partículas totais em suspensão, partículas inaláveis, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio, ozônio e monóxido de carbono.

### Organismos e exposição

O organismo utilizado foi o *C. aspersus*, molusco terrestre de idade adulta. Duas semanas foram utilizadas para aclimação e possível detoxificação dos animais. Alface orgânica (sem agrotóxico) e água foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram mantidos em gaiolas de propileno.

Inicialmente realizou-se teste com exposição à UV, para adaptação da metodologia. Assim, foram utilizadas duas amostras celulares (hemolinfa e pulmão) e exposição *in vitro* à radiação UVC 4.5 J/m<sup>2</sup>. Foram coletadas amostras da hemolinfa dos indivíduos (n = 4), as quais, já em lâmina (6 lâminas/indivíduo, preparadas conforme próximo item), foram submetidas a diferentes tratamentos: (a) sem exposição à UV; (b) 4 segundos de exposição à UV; (c) 10 s de exposição à UV. Para coleta da hemolinfa, foi utilizada seringa de 3 ml para aspiração, a qual foi introduzida através da concha do molusco; e o pulmão foi obtido após dissecação.

Após padronização, foram formados 3 grupos de 7 moluscos por tempo de exposição no local de estudo, na estação de climatologia da Ulbra: (a) exposição às condições atmosféricas de 7 dias; (b) exposição de 15 dias; (c) exposição de 30 dias (para cada estação do ano). Além desses grupos, foram utilizados grupos-controle, sem exposição e mantidos em laboratório, de forma pareada (um grupo-controle para cada

grupo de exposição). Um total de 41 indivíduos foi utilizado como controle, em condições de temperatura (21-24°C) e luz (fotoperíodo de 12 h com luz branca) controladas em laboratório. Os organismos (n = 21) do grupo de inverno foram submetidos à exposição ambiental, no período de 22 de junho a 22 de julho de 2004, e do grupo de verão (n = 21), no período de 28 de fevereiro a 29 de março de 2005.

#### Avaliações de genotoxicidade e/ou mutagenicidade

O Ensaio Cometa foi realizado conforme descrito por Silva *et al.* (2000a e b) e Hartmann *et al.* (2003), com algumas modificações. As células de hemolinfa foram utilizadas diretamente, e as de pulmão, após dissociação em meio de cultura celular RPMI 1640 (Gibco). Aproximadamente 10 µL de cada amostra (células de hemolinfa e pulmão) foram embebidos em 95 µL de agarose Low Melting Point (0,75%). Essa mistura foi colocada em lâmina de vidro com cobertura de 300 µL de agarose normal a 1%. Depois da solidificação em geladeira, as lâminas foram colocadas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) por no mínimo 1 hora até duas semanas. As lâminas foram então incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 12,6) por 20 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por mais 15 minutos, a 25 volts e 300 Amps, e a alcalinidade foi neutralizada com 0,4 M Tris (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com uma solução com prata (5% carbonato de sódio, mais uma solução de 0,1% nitrato de amônia, 0,1% de nitrato de prata, 0,25% de ácido tungstosilicico e 0,15% de formaldeído).

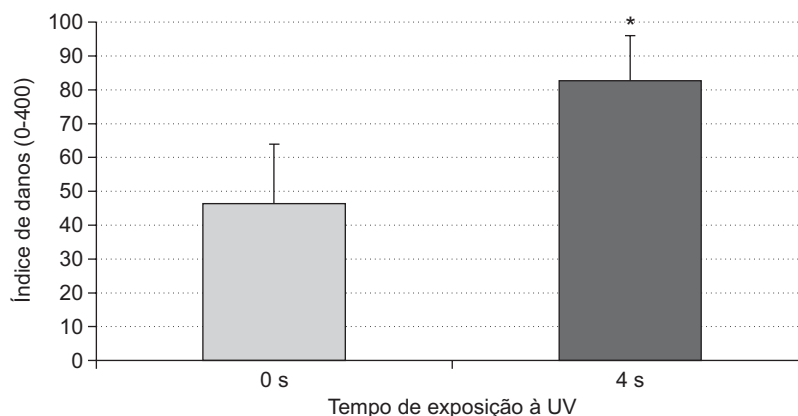
Quanto à observação ao microscópio, foram analisadas 100 células por indivíduo e por tecido (50 de cada lâmina duplicada). As células também foram classificadas, visualmente, em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda: sem danos – classe 0; até danos máximos – classe 4. Assim, o Índice de Danos de cada grupo estudado variou de zero (100X0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100X4; 100 células observadas com dano máximo).

Para certificar-se das condições corretas e da eficiência da eletroforese, conforme recomendação de Hartmann *et al.* (2003), foram usados controles negativo e positivo do teste. Para o controle positivo utilizou-se exposição à UV. As lâminas obtidas dos diferentes tecidos e indivíduos foram submetidas a diferentes tratamentos: (a) sem exposição à UV; (b) 4 s de exposição à UV. Os resultados só foram considerados se os controles negativos e positivos apresentassem resultados diferentes significativamente.

Avaliação estatística foi realizada por meio do teste t-Student, sendo considerado  $p < 0,05$  como nível de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o monitoramento da poluição atmosférica na estação de climatologia no campus Ulbra, Canoas, RS, por meio do Ensaio Cometa, utilizou-se como biomonitor o molusco *C. aspersus*. Todos os animais utilizados eram adultos, pesando entre 10,8 g e 17,9 g. Inicialmente foram realizados experimentos prévios com o molusco, buscando a padronização do teste. Após exposição à radiação UV, observou-se que para as células de hemolinfa não se obtiveram células viáveis para a análise de 10 s. Já 4 s apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de danos nas células (Figura 1). Essa diferença não foi observada para os pulmões talvez em razão de o nível basal de danos (controle negativo) ter sido maior em pulmões (Figura 2). Diferenças entre índices de danos nos níveis basais em diferentes tecidos já foram observadas por outros autores (Sasaki *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000b). O molusco *C. aspersus* apresentou-se como um bom organismo bioindicador para estudos em laboratório, como também o Ensaio Cometa para biomarcar. Com esse teste laboratorial também é possível verificar que a exposição à radiação UV mostrou-se como um bom controle positivo, sem a necessidade do uso de químicos tóxicos e mutagênicos. Resultado similar, quanto ao uso de UV como controle positivo, foi observado recentemente para mexilhão-dourado (Villela *et al.*, 2006).



**Figura 1** – Índice de danos em células de hemolinfa do *Cantareus aspersus* submetidas a diferentes tempos de exposição à UV. \*  $p < 0,05$  – teste t-Student.

Após a padronização do teste, os organismos foram submetidos à exposição ambiental (ar atmosférico da área de estudo). Os resultados referentes ao índice e frequência de danos das amostras de hemolinfa e pulmão, relacionados ao tempo de exposição e à estação do ano, além do grupo-controle, são demonstrados na Tabela 1 e nas Figuras 3 a 6. Para todas as eletroforeses realizadas, os controles negativos e positivos apresentaram diferenças significativas (t-Student,  $p < 0,05$ ), demonstrando eficiência do teste e, assim, resultados válidos (dados não demonstrados).

Células pulmonares mostraram-se mais sensíveis ao monitoramento, pelo fato de apresentarem maior índice de danos que as células da hemolinfa. Quanto ao tempo de exposição, observou-se que, quanto maior o tempo de exposição, mais danos ao DNA apareciam. Em relação às estações do ano (inverno e verão), verificaram-se níveis de danos maiores que os controles de forma significativa, porém sem grandes

diferenças entre as estações. Pode-se observar que o pulmão, tecido-alvo, apresentou pequeno aumento de lesões durante o inverno. Mas com essa diferença de sensibilidade para os diferentes tempos de exposição, demonstrou-se o possível uso desse organismo como um potencial biomonitor através do Ensaio Cometa. Segundo Cotelle & Férard (1999), é cada vez mais indicado o uso de Ensaio Cometa em espécies expostas *in natura*, determinando assim organismos-sentinela. A eficiência do gastrópoda *C. aspersus* (anteriormente *Helix aspersa*) no monitoramento ambiental já foi descrito anteriormente, mas em relação à dosagem de metais (Yasoshima & Takano, 2001) e atividade do citocromo P450 em resposta à exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Ismert, 2002). O último trabalho também sugere o *C. aspersus* como biomonitor por este apresentar metabolismo tão complexo quanto os mamíferos, demonstrando diferenças entre tecidos e efeito dose-resposta para naftaleno.

**Tabela 1** – Parâmetros biológicos e ambientais nas exposições de *Cantareus aspersus* no inverno e verão.

Tecido/estação	n	Índice de danos (ID)	Frequência de danos (%)	Umidade relativa U.R. (%)	Temperatura média (°C) (mín.-máx.)
<b>Hemolinfa/inverno</b>					
Controle	10	70,1 ± 48,1	29,2 ± 16,4	–	–
7 dias (22/6-28/6)	2	67,0 ± 11,3	34,0 ± 1,4	86,4%	17,5 (14,9-25)
15 dias (22/6-6/7)	4	82,7 ± 30,4	40,3 ± 22,7	85,0 %	17,8 (7-31)
30 dias (22/6-22/7)	4	236,4 ± 44,2***	74,4 ± 10,4***	86,4%	15,6 (3-31)
<b>Hemolinfa/verão</b>					
Controle	12	98,3 ± 49,4	49,7 ± 19,6	–	–
7 dias (28/2-6/3)	3	159,5 ± 42,8 *	80,0 ± 7,2***	80,0%	20,0 (12-30)
15 dias (28/2-14/3)	4	172,2 ± 29,5**	67,3 ± 6,2*	81,8%	29,3 (11-36)
30 dias (28/2-29/3)	4	202,0 ± 16,3***	78,5 ± 10,7**	82,3%	23,0 (13-28)
<b>Pulmão/inverno</b>					
Controle	8	180,0 ± 59,0	59,9 ± 14,5	–	–
7 dias (22/6-28/6)	1	81,0 ± 0,0	42,0 ± 0,0	86,4%	17,5 (14,9-25)
15 dias (22/6-6/7)	4	323,7 ± 14,9***	89,2 ± 8,5***	85,2%	17,8 (7-31)
30 dias (22/6-22/7)	4	324,5 ± 28,3***	87,5 ± 7,1***	86,4%	15,6 (3-31)
<b>Pulmão/verão</b>					
Controle	11	113,5 ± 29,0	52,8 ± 11,1	–	–
7 dias (28/2-6/3)	4	140,7 ± 25,1	61,2 ± 19,0	80,0%	20,0 (12-30)
15 dias (28/2-14/3)	4	200,7 ± 24,6***	85,3 ± 6,9***	81,8%	29,3 (11-36)
30 dias (28/2-29/3)	4	197,2 ± 25,2***	78,0 ± 6,5***	82,3%	23,0 (13-28)

\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – teste t-Student.

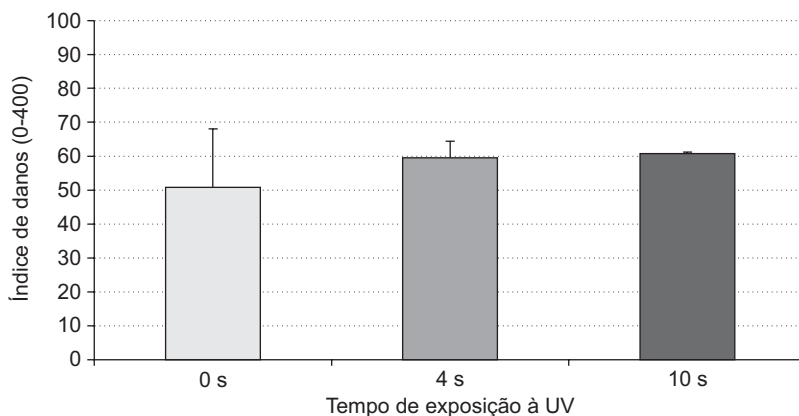


Figura 2 – Índice de danos nas células de pulmão de *Cantareus aspersus* submetidas a diferentes tempos de exposição à UV.

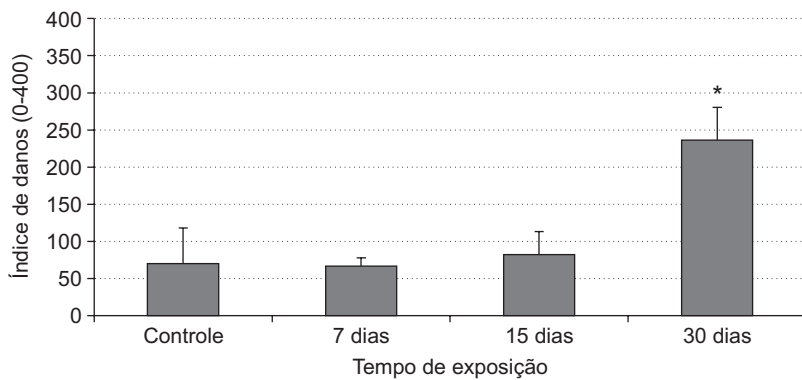


Figura 3 – Índice de danos em células de hemolinfa em *Cantareus aspersus*, estação inverno. \*  $p < 0,001$  – teste t-Student.

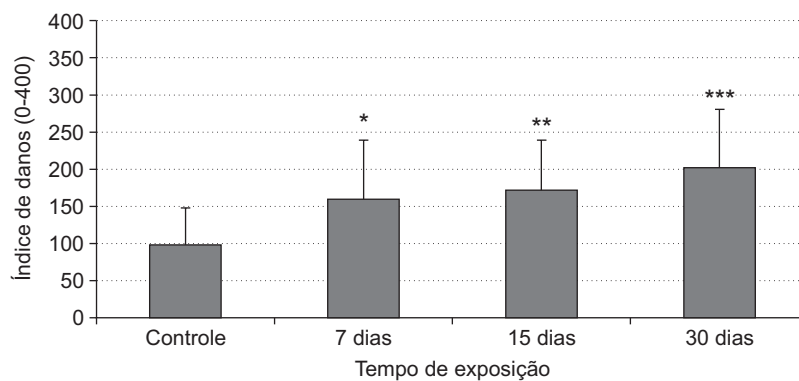
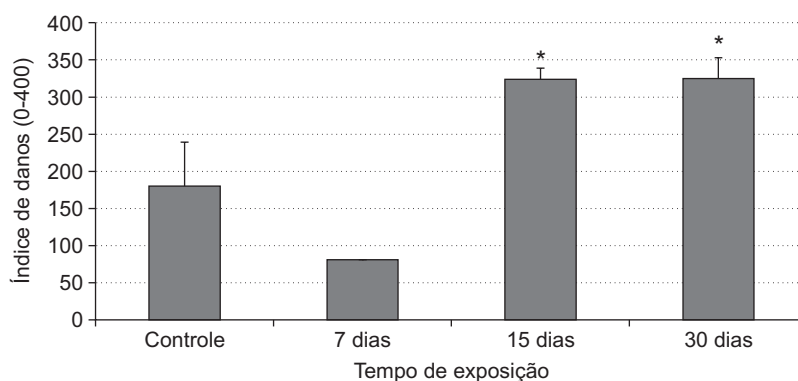
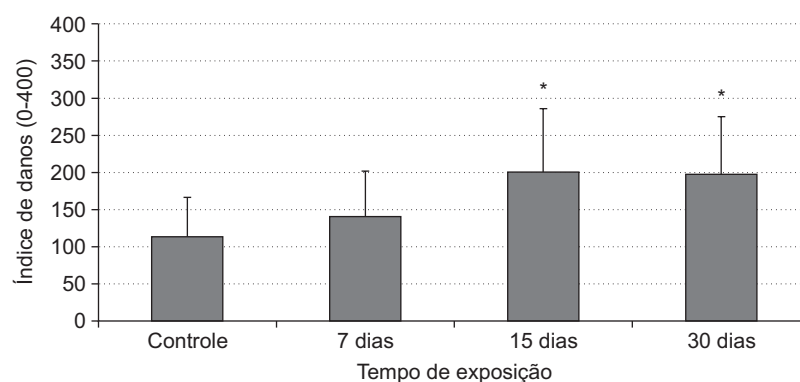


Figura 4 – Índice de danos em células de hemolinfa em *Cantareus aspersus*, estação verão. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – teste t-Student.



**Figura 5** – Índice de danos em células de pulmão em *Cantareus aspersus*, estação inverno. \*  $p < 0,001$  – teste t-Student.



**Figura 6** – Índice de danos em células de pulmão em *Cantareus aspersus*, estação verão. \*  $p < 0,001$  – teste t-Student.



As células de hemolinfa, durante o inverno, apresentaram aumento significativo do índice e frequência de danos para o grupo de animais expostos durante 30 dias ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1 e Figura 3). Já para amostras de verão, verificou-se aumento significativo de danos para 7 dias ( $p < 0,05$ ), 15 dias ( $p < 0,05$ ) e 30 dias ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1 e Figura 4), e para frequência de danos 7 dias ( $p < 0,001$ ), 15 dias ( $p < 0,05$ ) e 30 dias ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1). Em relação às células de pulmão, do grupo de inverno e verão (Figuras 5 e 6 e Tabela 1), o aumento é significativo para 15 dias e 30 dias ( $p < 0,001$ ), tanto para o índice de danos como para a frequência de danos.

Observa-se de forma geral que células pulmonares, tecido-alvo para poluição atmosférica, parecem ser mais sensíveis que a hemolinfa ao monitoramento, embora sem diferença significativa. Quanto às estações, não se observa relação entre temperaturas mais baixas, umidade relativa maior e danos no DNA. Embora não tenha sido observada significância na análise de regressão linear ( $Y = 21,26 - 0,0032 X$ ) e de coeficiente de correlação ( $r = -0,06$ ) para temperaturas mais baixas e índice de danos. Resultados similares foram obtidos por Heuser *et al.* (2002), em que não foi observado aumento de danos significativos para inverno, que também

citam diferentes autores que estudaram poluição por exaustão de automóveis sem verificar associação com temperaturas baixas. Geralmente essa associação se dá devido ao fenômeno da “inversão térmica”, que acaba concentrando os poluentes na região mais próxima da superfície (Duchiade, 1992). Já quanto ao tecido-alvo, Silva *et al.* (2000b), estudando roedores, observaram que os pulmões são bons indicadores para poluição atmosférica.

Quando comparados os resultados com o IQAr (Tabela 2) para cada período de exposição dos indivíduos de *C. aspersus*, embora os índices de partículas inaláveis (PM10) tenham sido um pouco maiores durante o inverno, os níveis foram considerados sempre regulares. De forma interessante esses dados corroboram nossos dados biológicos, uma vez que não houve diferença significativa entre as estações climáticas estudadas. Associações com o IQAr poderiam ser interessantes, visto que este pode ser associado aos efeitos da poluição do ar sobre a saúde humana. Nos Estados Unidos, por intermédio da EPA, o IQAr (EPA-454/R-99-010/1999) é aplicado na divulgação diária da qualidade do ar, indicando níveis de poluição, associando-os com os efeitos sobre a saúde e com os cuidados que devem ser adotados.

**Tabela 2** – Boletim Mensal da Qualidade do Ar – Rede Manual (durante inverno e verão).

Qualidade do ar	Inverno	Verão
IQAr médio:	65	50
Pior ocorrência:	14/6/2004	5/3/2005
Poluente detectado:	Partículas Inaláveis (PI 10 µm)	Partículas Inaláveis (PI 10 µm)
Cor:	 Regular 50-100 IQAr	 Regular 50-100 IQAr

Fonte: Adaptado de FEPAM (2005).

## CONCLUSÕES

Este estudo avaliou a sensibilidade do molusco *C. aspersus* para ser utilizado como organismo biomonitor (bioindicador) da poluição atmosférica, como também padronizou o Ensaio Cometa como biomarcador. O molusco *C. aspersus* apresentou-se como um bom organismo bioindicador para estudos em laboratório, como também o Ensaio Cometa para biomarcador. A exposição à radiação UV mostrou-se um bom controle positivo, sem a necessidade do uso de químicos tóxicos e mutagênicos.

A espécie e o método utilizados em conjunto mostraram-se sensíveis, baratos e efetivos para o uso no biomonitoramento da genotoxicidade ocasionada por poluição atmosférica, permitindo avaliações de saúde ambiental de forma continuada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COTELLE, S. & FÉRARD, J. F., 1999, Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutag.*, 34: 246-255.
- CREBELLI, R., CONTI, L., CROCHI, B., CARERE, A., BERTOLDI, C. & GIACOMO, N. D., 1995, The effect of fuel composition on the mutagenicity of diesel engine exhaust. *Mutation Res.*, 346: 167-172.
- DUCHIADE, M. P., 1992, Air pollution and respiratory diseases: a review. *Cad. Saúde Pública*, 8: 311-330.
- FREIRE, R., 2000, Controle da poluição atmosférica. *Rev. Adusp*, 20: 56-62.
- HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V. & TICE, R. R., 2003, Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18: 45-51.
- HEUSER, V. D., SILVA, J., MORISKE, H., DIAS, J., YONEAMA, M. & FREITAS, T., 2002, Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environ. Mol. Mutag.*, 40: 227-235.
- ISMERT, M., OSTER, T. & BAGREL, D., 2002, Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere*, 46: 273-80.
- MAGE, D., OZOLINS, G., PETERSON, P., WEBSTER, A., ORTHOFER, R., VANDEWEERD, V. & GWYNNE, M., 1996, Urban air pollution in megacities of the world. *Atmosp. Environ.*, 30: 681-686.
- SASAKI, Y. F., NISHIDATE, E., IZUMIYAMA, F., MATSUSAKA, N. & TSUDA, S., 1997, Simple detection of chemical mutagens by alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutation Res.*, 391: 215-231.
- SILVA, J., FREITAS, T. R. O., MARINHO, J. R., SPEIT, G. & ERDTMANN, B., 2000a, Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental *in vivo* biomonitoring with native rodents. *Gen. Mol. Biology*, 23: 241-245.
- SILVA, J., FREITAS, T. R. O., HEUSER, V., MARINHO, J. R., BITTENCOURT, F., CERSKI, C. T., KLIEMANN, L. M. & ERDTMANN, B., 2000b, Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutation Res.*, 470: 39-51.
- VICTORIN, K., 1994, Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutation Res.*, 317: 43-55.
- VILLELA, I. V., OLIVEIRA, I. M., SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P., 2006, DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Linnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Res.*, 697: 78-86.
- YASOSHIMA, M. & TAKANO, B., 2001, *Bradybaena similaris* shell as a biomonitor of copper, cadmium, and zinc. *Bull. Environ. Cont. Toxicology*, 66: 239-248.