290

LINHAGENS DE *ASPERGILLUS NIDULANS* COMO BIOSSENSORES DE EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIGENOTÓXICOS DE AGENTES AMBIENTAIS

FERNANDO DOMINGUES ZUCCHI

Tese apresentada à Comissão do
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da
Universidade de São Paulo (Instituto
de Ciências Biomédicas), Instituto
Butantan e Instituto de Pesquisas
Tecnológicas, para a obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Doutor Aluizio Borém

SÃO PAULO

2005

LINHAGENS DE *ASPERGILLUS NIDULANS* COMO BIOSSENSORES DE EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIGENOTÓXICOS DE AGENTES AMBIENTAIS

FERNANDO DOMINGUES ZUCCHI

Tese apresentada à Comissão do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (Instituto de Ciências Biomédicas), Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Doutor Aluizio Borém

SÃO PAULO

2005

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

T-ICB
BIOT
QH323.6
Z94la
2006

Zucchi, Fernando Domingues.

Linhagens de *Aspergillus nidulans* como biossensores de efeitos genotóxicos e antigenotóxicos de agentes ambientais / Fernando Domingues Zucchi. -- São Paulo, 2005.

Orientador: Aluízio Borém.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética molecular de microorganismos.

Versão do título para o inglês: *Aspergillus nidulans* strains as biosensors of genotoxic and antigenotoxic effects of environmental factors.

Descritores: 1. *Aspergillus nidulans* 2. Genotoxicidade 3. Antigenotoxicidade 4. Benzeno 5. Metilação 6. Soja I. Borém, Aluízio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB147/2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, IPT – Instituto de Pesquisas
Tecnológicas

Candidato: Fernando Domingues Zucchi.

Título da Dissertação: Linhagens de *Aspergillus Nidulans* como Biossensores de Efeitos Genotóxicos e Antigenotóxicos de Agentes Ambientais.

Orientador: Prof. Doutor Aluizio Borém

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 09 / 06 /2006, considerou,

(☒) Aprovado

(☐) Reprovado

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Benedito Corrêa

Instituição:

ICB/USP

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Aluizio Borém

Instituição:

Universidade Federal de Viçosa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 109, referente ao projeto intitulado "*Linhagens de aspergillus nidulans como biossensores de efeitos genotóxicos e antígenotóxicos de agentes ambientais*" sob a responsabilidade de **Fernando Domingues Zucchi**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPESH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 07 de outubro de 2005.

Prof. Dra. MARÍLIA C.L. SEELAENDER
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPESH - ICB/USP

DEDICATÓRIA

*Ao meu querido filho **João Victor**, por me fazer confiar no futuro, dedico.*

AGRADEDECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de forma altruísta, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. A todos que me abrigaram e me apoiaram nos seus laboratórios para a realização dos experimentos complementares e necessários, a minha eterna gratidão.

Ao Prof. **Dr. Aluízio Borém**, pela confiança e apoio durante a realização deste trabalho e, sobretudo pela orientação e amizade.

Aos meus pais, **Drs. Tânia e Ronaldo Zucchi**, pelo exemplo e estímulos constantes. A **Dra. Paola Poli** cuja paciente orientação me foi tão significativa.

Agradecemos ainda aos colegas e amigos **Tiago Domingues Zucchi, Gutenberg Delfino de Souza, Jean César Farias Queiroz, Nanci O. C. R. Dezotti, Vânia Flauzino**, que tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos **Docentes do Curso do Programa Integrado de Pós-Graduação**, pela paciência e as muitas lições de vida.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação de Biotecnologia, **Profa. Dra. Ana Clara Schenberg**.

À muito querida **D. Maria Jacinta Filha Santos** de quem, todos nós do Laboratório de Genética de Fungos Filamentosos do ICB-USP, tanto dependemos. O seu trabalho meticuloso, a sua atenção e, principalmente, a sua camaradagem, conseguiram tornar nossa lida menos cansativa.

A Senhora **Maria José Jesus de Carvalho**, funcionária da Biblioteca do ICB-USP, pela orientação segura na normalização e correção das referências de acordo com a Norma ABNT.

A Sra. **Eva Aparecida de Oliveira**, funcionária da Biblioteca do ICB, pelo auxílio na confecção da Ficha Catalográfica e pelas informações dos detalhes importantes para a disponibilização deste trabalho on-line.

Ao ***Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, do Campus de São Paulo***, pela oportunidade oferecida.

Este trabalho contou com o apoio da **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior-Brasil) e **UNIDO** (United Nations for Industrial Development).

Não há verdade absoluta. Nossas verdades científicas não passam de hipóteses que ainda não foram refutadas, que acabarão por serem substituídas. No pior dos casos, as “verdades” de hoje, depois da próxima revolução científica, nos parecerão pitorescas e absurdas, se não realmente falsas. O melhor que os cientistas podem almejar é uma série de aproximações que progressivamente reduzem os erros, sem nunca chegar a eliminá-los.

THOMAS KUHN

(in Dawkins, R., 2005)

RESUMO

RESUMO

ZUCCHI, F.D. Linhagens de *Aspergillus Nidulans* como Biossensores de Efeitos Genotóxicos e Antigenotóxicos de Agentes Ambientais. 2005. 201 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O principal objetivo deste trabalho é o de estabelecer uma estratégia confiável relacionada a genotoxicidade, proteção genômica e recombinação mitótica em *Aspergillus nidulans*. A genotoxicidade foi induzida por vapor de benzeno e, para testar a proteção genômica, a soja (*Glycine max*) foi usada devido às suas propriedades anticarcinogênicas muito conhecidas. O principal resultado obtido foi que a soja transgênica mostrou maiores propriedades antigenotóxicas do que a soja tradicional. Isto foi duplamente confirmado, tanto através de estratégias de genética clássica, como molecular. Além disso, cada experimento foi repetido três vezes. Principais conclusões foram as seguintes: a) estabelecimento de um protocolo adequado para atender às complexidades dos eventos epigenéticos e, b) a aplicação desse tal protocolo e experimentos afins para testar outros agentes ambientais suspeitos de apresentarem propriedades antigenotóxicas, ou que precisem de sua identificação como tal. Evidentemente, levando-se em conta a grande preocupação relacionada aos alimentos transgênicos e aos muitos produtos de biotecnologia que entram no mercado, o elenco de prováveis candidatos aos tipos de testes apresentados, será muito grande. Como os resultados obtidos sugerem íntima relação entre metilação de DNA eucariótico, a recombinação mitótica e outros eventos danosos às células, os eventos envolvidos serão epigeneticamente discutidos.

Palavras-chave: *Aspergillus nidulans*, benzeno, recombinação mitótica, genotoxicidade, antigenotoxicidade, epigenética, metilação do DNA.

ABSTRACT

ABSTRACT

ZUCCHI, F.D. *Aspergillus Nidulans* strains as Biosensors of Genotoxic and Antigenotoxic Effects of Environmental Factors. 2005. 201 f. Thesis (DR in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Main aim is to provide a reliable approach to deal with the aspects related to induced genotoxicity, genomic protection and eukaryotic mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. Genotoxicity was benzene fumes induced, and to test genomic protection, soybean (*Glycine max*) has been used on account of its putative anticarcinogenic properties. Main outcome is that transgenic soybean bears higher antigenotoxic properties than traditional soybean. This has been twofold confirmed through basic genetic approaches and molecular approaches, as well. In addition, each experimental approach has been three times repeated. Additional important outcomes are: a- establishment of a reliable protocol to deal with the complexities of the epigenetic events, and b- likely use of present protocol and experimental set-up to test other environmental agents of which antigenotoxic properties are either suspected, or need precise identification. Evidently, on account of present wide concern the transgenic foodstuffs, and many other biotechnological products, as well, are obvious candidates for similar approaches. Obtained results suggest close relationships among eukaryotic DNA methylation, mitotic recombination, and other cells damaging events reputedly leading to carcinogenesis.

Key-words: *Aspergillus nidulans*, benzene, mitotic recombination, genotoxicity, antigenotoxicity, epigenetics, DNA methylation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Morfologia das linhagens diplóides.....	50
Figura 2.	Produção de diplóides UT448//UT184 ou <i>Dp</i> (II-I)//UT184.....	54
Figura 3.	Morfologia do diplóide <i>Dp</i> (II-I)//UT184 em MC (A) e em MM....	64
Figura 4.	Efeitos genotóxicos de vapor de benzeno (20 s) sobre a morfologizada colônia de <i>Dp</i> (II-I)//UT184 em MM (A).....	72
Figura 5.	Efeitos antígenotóxicos da soja convencional (MSo) ou transgênica(MSoT) no diplóide de <i>Dp</i> (II-I)//UT184 de <i>A. nidulans</i> tratado com vapor de benzeno.....	74
Figura 6.	Etapas de análises mitóticas convencionais dos diplóides controlesUT448//UT184 (à direita) e <i>Dp</i> (II-I)//UT184 (à esquerda) inoculados em MC + pFA.....	75
Figura 7 A.	Médias dos Índices de Homozigotização (HI) e % de diplóides não haploidizados derivados do diplóide UT448//UT184 após diferentes tratamentos.....	87
Figura 7 B.	Médias dos Índices de Homozigotização (HI) e % de diplóides não haploidizados, de diplóides derivados do <i>Dp</i> (II-I)//UT184 após diferentes tratamentos.....	88
Figura 7 C.	Efeitos de desmetilação na meiose. Dados completos das análises meióticas estão nas Tabelas 19, 20 e 21 do apêndice.....	88
Figura 8 A.	Eletroforese da tipificação das linhagens de <i>A. nidulans</i> <i>Dp</i> (II-I)//UT184, UT448//UT184; <i>Dp</i> (II-I)//UT184; UT448; UT184.....	96
Figuras 8 B	Grupos de Similaridade.....	96
Figuras 9 A e B.	Perfis de amplificação por RAPD para os primers V10, C20, G10, J20, M20, Q20 e K10.....	100
Figura 9 C -	Grupamentos de similaridade de discriminação dos diplóides UT448//UT184 com e sem tratamentos (método Jaccard's Coefficient).....	101

Figura 9 D -	Grupamentos de similaridade de discriminação dos diplóides UT448//UT184 com e sem tratamentos (método Simple matching coefficient).....	101
Figura 9 E -	Grupamentos de similaridade de discriminação dos diplóides <i>Dp</i> (II-I)//UT184 com e sem tratamentos.....	102
Figura 9 F -	Grupamentos de similaridade de discriminação dos diplóides UT448//UT184 com e sem tratamentos.....	102

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1-	Mapa parcial do <i>Dp</i> (II-I)//UT184.....	49
Diagrama 2-	Fluxograma de Trabalho.....	61
Diagrama 3-	Determinação do HI.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Seqüências nucleotídicas dos primers usados em RAPD do <i>A. nidulans</i>	42
Tabela 2-	Lista das análises mitóticas realizadas, via ciclo parassexual.....	79
Tabela 3-	Segregantes Alélicos (+/-) do diplóide UT448//UT184 depois de vários tratamentos.....	82
Tabela 4-	Segregantes alélicos (+/-) do diplóide <i>Dp</i> (II-I) //UT184 depois de vários tratamentos.....	83
Tabela 5-	Média dos HI e % dos diplóides (não haploidizados em <i>pFA</i>) depois dos diferentes tratamentos.....	83
Tabela 6-	Índice de Homozigotização (HI) de vários marcadores do diplóide UT448//UT184 antes e depois da exposição ao vapor de benzeno e à soja.....	84
Tabela 7-	Índice de Homozigotização (HI) de vários marcadores do diplóide <i>Dp</i> (II-I)//UT184 antes e depois da exposição ao vapor de benzeno e a soja.....	85
Tabela 9-	Comparações e contrastes entre o teste do Índice de Homozigotização (HI) com outros 5 testes de genotoxicidade conhecidos.....	108

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Genotoxicidade e antigenotoxicidade.....	02
1.2. Teste rápido com linhagens diplóides de <i>Aspergillus nidulans</i>	05
1.3. Testes biossensores de genotoxicidade e de antigenotoxicidade.....	06
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
2.1. Estado atual do conhecimento.....	10
2.1.1 Metilação do DNA.....	12
2.1.2. Fenômenos epigenéticos.....	14
2.1.3. Metilação e silenciamento gênico.....	15
2.1.4. Recombinação x metilação.....	16
2.2. Metilação anormal do DNA e câncer.....	19
2.2.1. Hipometilação global, seguida da hipermetilação sítio-específica são características comuns a todas células de tumor.....	21
2.3. Dieta e metilação do DNA.....	21
2.3.1. A dieta.....	23
2.4. Metilação do DNA é altamente mutagênica.....	26
2.6.1. Os resíduos de 5-metil citosina, no DNA, são "hot-spots" para a mutagênese de transição.....	26
2.5. Metilação e crossing-over.....	28
2.6. Linhagens de fungos diplóides, indicadoras de efeitos carcinogênicos ambientais.....	30
2.6.1. Vantagens de linhagens especiais de <i>A. Nidulans</i> para avaliação do potencial recombinagênico/carcinogênico de substâncias químicas.....	31

2.7. O benzeno como poderoso agente genotóxico e carcinogênico.....	34
2.8 Produtos de biotecnologia e detecção rápida do potencial genotóxico e antigenotóxico.....	38
2.8.1 Testes de antigenotoxicidade.....	38
2.9. Análises moleculares.....	40
2.6.1. Análises Moleculares: Avaliação de Fenômenos Epigenéticos em linhagens diplóides de <i>A. Nidulans</i>	40
2.6.2. Seleção de “primers” aleatórios.....	41
3. OBJETIVOS.....	43
4. HIPÓTESE DE TRABALHO.....	45
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.1. Linhagens haplóides originais e mutantes.....	48
5.1.1. Linhagens.....	48
5.1.2. Meios de Cultura e Soluções.....	50
5.1.3. Preparação de suspensões de conídios.....	53
5.2. Análises Genéticas.....	53
5.2.1. Obtenção do heterocário.....	53
5.2.2. Obtenção dos diplóides.....	54
5.2.3. Análises mitóticas.....	55
5.2.4. Análises meióticas.....	56
5.2.4.1. Desmetilação da linhagem UT196 <i>metA17</i>	57
5.3. Exposição de diplóides de <i>A. nidulans</i> aos agentes genotóxicos e antigenotóxicos.....	58
5.3.1. Avaliação de genotoxicidade.....	59
5.3.2. Avaliação de antigenotoxicidade.....	65

5.4. Análises moleculares.....	65
5.6.1. Extração de DNA.....	65
5.4.2. Condições da Reação de PCR.....	66
5.4.3. Detecção de alterações epigenéticas pela exposição dos diplóides aos agentes genotóxicos através de RAPD.....	66
5.5 Análises estatísticas.....	67
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
6.1. Estratégias para estudos dos fenômenos epigenéticos relacionados com a recombinogênese e carcinogênese.....	70
6.2. Alterações morfológicas após tratamentos genotóxicos e antigenotóxicos....	71
6.3.....Análises genéticas.....	76
6.3.1. Análises mitóticas	76
6. 4. Comparações entre os resultados das análises mitóticas.....	81
6.5. Análises genéticas dos controles.....	85
6. 5. 1. Tratamento com vapor de benzeno.(Genotóxico).....	86
6. 5. 2. Tratamento com soja (Antigenotóxico)	89
6. 5. 3. Tratamento com vapor de benzeno.(Genotóxico) e com soja (Antigenotóxico).....	89
6. 6. Análises meióticas linhagens desmetiladas.....	90
6.7. Análises moleculares.....	92
6. 7. 1. Linhagens parentais (controles).....	93
6.7. 2. Diplóides tratados.....	97
7. CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
GLOSSÁRIO.....	121
APÊNDICE.....	126
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. GENOTOXICIDADE E ANTIGENOTOXICIDADE

Atualmente assiste-se ao crescente interesse por pesquisas visando à detecção de fatores da dieta que podem estar envolvidos na proteção da saúde humana (SINGH *et al.*, 2003). Como os eventos epigenéticos promovem mudanças na expressão dos genes via alteração do estado de metilação do DNA, eles representam excelentes alvos para fornecer informações sobre fatores ambientais (incluindo os da dieta) que podem reduzir os danos à saúde, os riscos de câncer, etc. (CHRISTMAN *et al.*, 1993).

Alterações na metilação do DNA em eucariotos superiores podem levar à expressão de genes aberrantes e à instabilidade mitótica e estes, por sua vez, podem estar relacionados às complexas etiologias de doenças multifatoriais, incluindo vários tipos de câncer (BESTOR, 1998; WHITELOW e MARTIN, 2001; SADO *et al.*, 2000; DAVIS *et al.*, 1998). A metilação de DNA eucariótico envolve primariamente a adição covalente de um grupo metil na posição 5' da citosina no dinucleotídeo CpG. No genoma humano os dinucleotídeos CpG não são uniformemente distribuídos. Assim, entre as 12 possíveis posições de pareamento dos dinucleotídeos (SEDGWICK, 2004), CpG corresponde a 20 % da frequência esperada (BIRD, 1986; JONES *et al.*, 1992). Além disso, os dinucleotídeos CpG estão concentrados em 60% das regiões promotoras. Tais grupos são conhecidos como ilhas de CpG, cujo comprimento pode atingir até 1000 nucleotídeos (JONES, *et al.*, 1992). Na região do promotor, o estado de metilação dos dinucleotídeos regula as interações entre uma dada sequência de DNA com várias proteínas como: fatores de transcrição, DNA metil transferases, enzimas modificadoras de histonas,

diacetilases e outros fatores modificadores de cromatina (ISSA, 2000). Em geral, essas interações DNA-proteína alteram a configuração do DNA e indicam se o gene restringirá ou favorecerá uma dada transcrição.

Assim, parece provável que a metilação do DNA está invariavelmente envolvida em todas funções celulares normais e anormais. Há muito tempo, RAZIN e RIGGS (1980) já sugeriam a existência de uma correlação entre o estado de atividade dos genes e a ausência de metilação nas regiões reguladoras e, também, entre a estrutura da cromatina e o estado de metilação do DNA (RAZIN e CEDAR, 1991). Mais recentemente, Szyf (2001) sugeriu que o padrão de metilação do DNA representa firme estado de equilíbrio das reações de metilação e de demetilação do DNA. Sendo que a metilação do DNA é catalizada por uma DNA metiltransferase e a demetilação envolve uma desmetilase (revisão de SINGH *et al.*, 2003, e referências inclusas). Em animais, mutações que levam à produção de DNA metil transferase anormal resultam na síndrome da imunodeficiência (ICF) cujos efeitos envolvem anormalidades imunológicas e outras desordens genéticas. Uma enzima anormal, relacionada com a metilação da citosina, leva à síndrome de Rett e da imunodeficiência (AMIR *et al.*, 1999; HANSEN *et al.* 1999). Na velhice sítios de metilação alterada e ausência de reparo são muito comuns. Há algumas evidências que indicam que a metilação anormal pode aumentar a ocorrência do *lupus* humano (RICHARDSON *et al.* 1990).

Metilação do DNA, aumentada ou diminuída, está freqüentemente envolvida aos cânceres humanos e na proliferação anormal das células (SINGH *et al.*, 2003). As características da metilação do DNA podem ser úteis para se detectar as etapas precoces da doença e também para monitorar a eficiência dos tratamentos do câncer (EHRlich, 2002).

Em eucariotos, a metilação do DNA aparentemente suprime a recombinação mitótica o que é particularmente importante em mamíferos, pois muitas células de câncer carregam rearranjos de DNA que podem estar relacionados à recombinação homóloga entre seqüências repetidas. Isto também, por sua vez, está relacionado à transferência de metilação do alelo metilado para o não metilado, *via* contatos entre as duas moléculas de DNA parentais (MOULTON *et al.*, 1994; MEYER *et al.*, 1993; COLOT *et al.*, 1996; HOLLIDAY, 1987) podendo levar a outras conseqüências já que fatores afetando a metilação do DNA também afetam o processo de recombinação mitótica (COLOT e ROSSIGNOL, 1999).

Em mamíferos, a recombinação mitótica induzida leva, freqüentemente, a homozigose de genes recessivos, cuja expressão pode representar um aumento do potencial carcinogênico (LAIRD e JAENISCH, 1996). Apesar de ambos mecanismos, recombinação e metilação do DNA, serem considerados componentes fundamentais dos mecanismos epigenéticos, ainda são escassos os sistemas biológicos disponíveis para se estudar a metilação do DNA relacionada à recombinação induzida por fatores ambientais.

É exatamente nestas áreas que o *Aspergillus nidulans*, com bases genéticas muito bem conhecidas, pode vir a ser muito útil.

Assim, testes rápidos construídos especialmente para a detecção rápida das alterações da metilação do DNA, induzidas por doses subtóxicas de poluentes ambientais, *in vivo*, podem relacionar as alterações do DNA com as respectivas alterações dos mecanismos epigenéticos (KNIGHT *et al.*, 2004; CREBELLI, 2001).

1.1. TESTE RÁPIDO COM LINHAGENS DIPLÓIDES DE *Aspergillus nidulans*

O teste da determinação do Índice de Homozigotização (HI), desenvolvido por Pires e Zucchi (1994), permite a investigação da ocorrência da recombinação mitótica. Duas linhagens diplóides especiais de *A. nidulans* foram usadas: uma delas apresenta mecanismos de recombinação normal (UT448//UT184), enquanto que a outra (*Dp* II-I//UT184) foi construída usando-se uma linhagem haplóide Master (UT184) e uma outra, mutante de recombinação (*Dp* II-I). Ambos diplóides são portadores de vários marcadores genéticos espalhados por todos os oito cromossomos do fungo. A linhagem diplóide *Dp* (II-I)//UT184 é especialmente sensível a vários agentes genotóxicos ambientais, físicos, químicos ou biológicos, mesmo em doses submutagênicas. Lesões induzidas no DNA quando, não reparadas imediatamente, estimulam a recombinação mitótica (PIRES e ZUCCHI, 1994; 1998) e aumentam a frequência de homozigotização das mutações recessivas auxotróficas.

Neste trabalho, foi aplicado este teste rápido do *A. nidulans* para comparar as propriedades antigenotóxicas da soja tradicional com as da soja transgênica (*Glycine max*). As características antigenotóxicas/anticarcinogênicas da soja convencional são conhecidas após a constatação da baixa incidência de câncer de seio nas mulheres orientais que têm a soja como principal componente da dieta (WU *et al.*, 1998). Este fato está relacionado aos isoflavonóides da soja (genisteína e daidzeína) que possuem estrutura química similar ao estradiol (LEE *et al.*, 1991; ZHENG *et al.*, 1999).

O benzeno, um composto volátil, com presença generalizada no ambiente é considerado responsável pela indução de efeitos nocivos aos animais.

Ele foi o agente escolhido para representar a carga genotóxica ambiental, pois a exposição de animais aos vapores do benzeno, pode levar a efeitos hematotóxicos, clastogênicos e leucogênicos (MAC EACHERN *et al.*, 1992). Além disso, a genotoxicidade do benzeno já foi demonstrada em de vários estudos *in vivo* evidenciando-se as seguintes alterações: na frequência de micronúcleos (RANALDI, *et al.*, 1998), na frequência de trocas entre cromátides irmãs, no número de aberrações cromossômicas (MAJOR *et al.*, 1994), na frequência de mutações no *locus* da hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (WARD *et al.*, 1992). Lan *et al.* (2004) evidenciaram efeitos perigosos para a saúde de acordo com os padrões atuais do teor de benzeno no ar e nos ambientes de trabalho dos americanos. Este trabalho mostrou os riscos de hematotoxicidade causadas pela exposição continuada ao benzeno, mesmo em baixas doses aéreas, tais como 1 ppm.

1.2. TESTES BIOSSENSORES DE GENOTOXICIDADE E DE ANTIGENOTOXICIDADE

Para avaliar os riscos genotóxicos do benzeno, há vários tipos de testes atualmente disponíveis, nos quais a maioria é usada para monitorar os riscos ocupacionais e/ou ambientais do benzeno. Infelizmente, a maioria de tais testes é dispendiosa, demorada e usa elevado número de animais de laboratório. Recentemente (ZUCCHI *et al.*, 2005) mostraram que a exposição de conídios do diplóide *Dp* (II-I)//UT184 ao vapor de benzeno (saturado) durante 20 s foi suficiente para induzir alterações no DNA, com significativo aumento das frequências de recombinação mitótica. Nossos achados, junto com os de Mullin, *et al.* (1998), Hopkin (2004), e Fukata (2004) motivaram nossa decisão de usar doses

submutagênicas de vapor de benzeno neste trabalho. É preciso enfatizar que alterações promovidas pelas baixas doses de benzeno não correspondem a mutações verdadeiras. Elas estão relacionadas às alterações do padrão de metilação do DNA e, portanto, às alterações epigenéticas (FUKATA, 2004). Provas disto vieram dos tratamentos com DNA/RNA exógenos quando as alterações induzidas são facilmente revertidas, pelo tratamento com 5-azacitidina, um conhecido agente hipometilante (BULL e WOOTON, 1984; PIRES e ZUCCHI, 1998; CASTRO-PRADO e ZUCCHI 1996; CASTRO-PRADO *et al.*, 1996). Teoricamente, alterações eventuais no padrão de metilação, induzidas pelo benzeno, também podem ser restauradas por substâncias conhecidas por suas propriedades antígeno-tóxicas tais como a soja.

A maioria dos testes conhecidos usa, como biossensores, bactérias indicadoras. Apesar de suas vantagens (grandes populações em pequenos espaços, crescimento rápido, baixo custo e facilidades de manutenção), há também algumas desvantagens no seu uso. As células bacterianas podem ser relativamente frágeis no ambiente de sensores. Além disso, as respostas celulares a algumas moléculas, em procariotos são muito diferentes das respostas das células eucarióticas, limitando muito a sua aplicação na avaliação da toxicidade e seleção de drogas usadas para organismos superiores. Células de fungos podem superar todas as limitações apresentadas pelas bactérias podendo ainda fornecer informações mais relevantes e diretamente aplicáveis a vários outros organismos eucarióticos (BARONIAN, 2004; BECHOR, *et al.*, 2002).

Para confirmar a sensibilidade das linhagens diplóides de fungos, para a detecção simultânea da genotoxicidade de doses submutagênicas de agentes carcinogênicos e também dos efeitos antígeno-tóxicos de alimentos

conhecidos (tradicionais ou transgênicos), foi adotada a seguinte estratégia: linhagens especiais serão tratadas com doses submutagênicas de agentes suspeitos de genotoxicidade e, em seguida serão tratadas com agentes antigenotóxicos. As freqüências de recombinação mitótica serão determinadas antes e depois dos tratamentos com os agentes genotóxico e antigenotóxico. Quanto maior o diferencial entre as freqüências de crossing-over mitótico, observadas entre os dois tratamentos do fungo, maior será a eficiência do agente antigenotóxico.

Após as análises genéticas dos fungos tratados e da determinação do diferencial das freqüências de recombinação mitótica entre os dois tratamentos, quando estatisticamente significativas, fornecerão as informações sobre o potencial da genotoxicidade e da antigenotoxicidade dos agentes estudados. Pequenas adaptações permitirão a aplicação deste teste, caso a caso, a qualquer agente suspeito de genotoxicidade/antigenotoxicidade sendo, os alimentos transgênicos e derivados, os melhores candidatos.

Vale ressaltar as vantagens dos testes que utilizam microrganismos das mais variadas origens, sobre os testes que utilizam animais: esses testes têm se mostrado muito confiáveis, simples de serem executados, rápidos e pouco onerosos. Apresentam, ainda, especial sensibilidade, devido a grande população de células que podem ser tratadas e analisadas. Entretanto, estes testes apresentam a desvantagem de serem extremamente específicos para cada caso e, com o advento da biotecnologia, não há testes (já validados) suficientes para se avaliar os possíveis danos que os OGM e derivados podem causar à saúde humana e animal.

2.*REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ESTADO ATUAL DO CONHECIMENTO

Um evento genético pode levar a mutagênese que causa alterações irreversíveis, qualitativas ou quantitativas, na informação genética, ao nível do gene ou do cromossomo. Historicamente, a frequência de mutagênese tem sido focalizada como sendo o melhor indicador do potencial carcinogênico de agentes ambientais. Recentemente, tem havido a emergência de vários estudos da carcinogênese por eventos de origem não genotóxica, onde as mudanças na expressão dos genes, ou alterações epigenéticas, têm contribuído para o desenvolvimento do processo carcinogênico.

Nas células o DNA está associado a proteínas histonas formando um complexo conhecido como cromatina. Modificações químicas no DNA ou nas histonas, alteram a estrutura da cromatina sem mudar a seqüência dos nucleotídeos do DNA. Estas modificações são conhecidas como alterações epigenéticas.

Assim, mudanças no DNA e nas suas proteínas associadas podem alterar a expressão dos genes sem alterar a seqüência do DNA. Mudanças na estrutura da cromatina têm uma profunda influência na expressão dos genes: se a cromatina está condensada, os fatores envolvidos na expressão dos genes não podem alcançar o DNA e os genes podem ser “desligados”. Por outro lado, se a cromatina está “aberta”, os genes podem ser “ligados” quando requeridos. A modulação epigenética inclui as alterações na expressão dos genes, ao nível da transcrição, tradução e ou da pós-tradução. Isto torna os eventos epigenéticos

reversíveis. Além disso, modificações epigenéticas variam com as diferenças sutis das condições ambientais.

Como metilação alterada no DNA é potencialmente reversível apenas a mudança no estado de metilação não pode ser indicação de potencial de toxicidade. Assim, nem todas mudanças no programa epigenético podem ter efeitos adversos à saúde humana. É preciso se levar em conta diferenças dos programas epigenéticos específicos dos tecidos.

Desde que a modificação epigenética tem um papel importante no câncer, novas estratégias terapêuticas estão sendo desenvolvidas com base na reversão da metilação do DNA e na inibição da deacetilação das histonas. Estas estratégias estão sendo combinadas com novas tecnologias para o rápido “screening” do genoma em busca dos padrões de metilação do DNA e de acetilação das histonas.

Enquanto muitas doenças humanas hereditárias são causadas por mudanças nas seqüências do DNA (mutações verdadeiras) que abolem a expressão dos genes, há um número enorme de doenças humanas que são causadas pelo silenciamento de genes, de forma inadequada, promovidas por modificações epigenéticas. Muitos cânceres envolvem o silenciamento epigenético dos genes que normalmente controlam a proliferação celular. As formas principais das modificações epigenéticas que ocorrem em tumores humanos são a metilação e a deacetilação de histonas.

Metilação do DNA é uma modificação química da molécula do DNA, executado pela enzima DNA metil transferase. Metilação pode impedir diretamente a expressão de genes evitando que os fatores de transcrição se liguem aos promotores. Entretanto, um efeito mais geral é a atração de proteínas ao radical

metil (MBD). Estas proteínas estão associadas com enzimas histona-deacetilases (HDACs) que funcionam para modificar quimicamente as histonas e para mudar a estrutura da cromatina. Cromatina contendo histonas acetiladas está aberta e acessível aos fatores de transcrição e os genes estão potencialmente ativos. Deacetilação de histona causa a condensação da cromatina tornando-a inacessível aos fatores de transcrição e os genes são silenciados (FURUMAI *et al.*, 2002).

2. 1. 1. METILAÇÃO DO DNA

O DNA de todos seres vivos consiste de uma única sequência de quatro bases: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) e Timina (T). Estas bases estão pareadas A com T e C com G na dupla fita de DNA. Metilação da citosina do DNA é uma modificação química do DNA, no qual um único Carbono, de um grupo metil (M), é adicionado a algumas citosinas. A citosina alterada conhecida como metil citosina (mC), age como uma quinta base e é um fator crítico na regulação dos genes. A enzima responsável pela metilação do DNA de seres humanos é conhecida como DNA citosina metil transferase (BROWN e STRATHDEE, 2002; BIRD, 1986).

Assim, no DNA de eucariotos, citosinas presentes nos sítios CpG apresentam, ou o “status” metilado ou o não metilado. Quando um sítio CpG é metilado em uma das fitas do DNA, durante a replicação o DNA fica metilado em ambas fitas graças à enzima DNA metil transferase, que metila os sítios CpG hemimetilados. Assim, o “status”, do DNA metilado ou não metilado, é herdado por ambas fitas filhas recém sintetizadas. Deste modo, a metilação do DNA serve como um marcador no DNA genômico que pode persistir através de várias gerações celulares (LEWIN, 1998).

Quando uma ilha CpG está localizada na região 5' de um gene, o seu estado de metilação funciona como um interruptor ("switch") molecular que pode "ligar ou desligar" a expressão do gene "downstream". Para a maioria dos genes, as ilhas de CpG não estão metiladas nas suas regiões 5' e, portanto, eles estão prontos para se expressarem.

Metilação do DNA de certas regiões do genoma humano pode causar silenciamento de genes de forma não apropriada. Mais de 65% de todos cânceres parecem envolver tais anormalidades da metilação. Muitos dos fármacos, em desenvolvimento, estão baseados na inibição de metilação como uma estratégia terapêutica para tratamento de tais tipos de cânceres. O padrão de metilação do DNA em uma célula afeta dramaticamente a função do DNA. Eventos de metilação anormais ocorrem durante o envelhecimento e no desenvolvimento de alguns cânceres que, geralmente, são considerados como desordens genéticas, pois freqüentemente envolvem mutações cromossômicas no DNA, que podem levar a perda da expressão de genes críticos para a manutenção do estado saudável.

Portanto, um grande número de cânceres não se origina de mutações, mas da metilação inadequada do DNA. Em muitos casos, a super metilação do DNA é suspeita de causar o câncer. Esta hipermetilação desliga de forma inadequada, genes críticos para o desenvolvimento de tumores (tais como genes supressores de tumores e genes de reparo do DNA), permitindo o desenvolvimento de cânceres. Se a enzima responsável pela metilação do DNA (DNA citosina metiltransferase), for inibida por um inibidor específico, a hiper metilação pode ser revertida, reativando-se a expressão dos genes supressores de tumores. Esta estratégia forneceu uma poderosa plataforma para o desenvolvimento de drogas anticâncer: inibindo-se a DNA citosina metiltransferase, a expressão de

genes pode ser reativada. A atividade desta enzima mostrou habilidade de reverter o curso do câncer em camundongos (ISSA *et al.*, 2000).

2.1.2. FENÔMENOS EPIGENÉTICOS

Eventos epigenéticos são mecanismos importantes pelos quais as funções dos genes são seletivamente ativadas ou inativadas. Tais mecanismos são evolutivamente conservados e apresentam implicações na carcinogênese, no desequilíbrio endócrino e na formação de células germinativas. Os fenômenos epigenéticos caracterizam-se pela transmissão de padrões de expressão gênica não dependentes da sequência do DNA. Diversos estudos corroboraram este fenômeno que representa um conceito pouco usado no ramo da genética. A possibilidade de registro deste evento em linhagens destinadas a modelos biológicos, em testes de mutagenicidade e de carcinogenicidade, pode contribuir significativamente para o desenho de testes específicos. Os processos epigenéticos envolvem uma variedade de proteínas reguladoras incluindo as DNA metiltransferases, proteínas que se ligam a metil-CpG do DNA, enzimas modificadoras de histonas, fatores remodeladores da cromatina, e complexos multimoleculares (BROWN e STRATHDEE., 2002).

Desde que eventos epigenéticos são suscetíveis a mudanças, eles representam os objetivos de muitas pesquisas para explicar como os fatores ambientais (incluindo a dieta) podem modificar riscos de câncer e o comportamento de tumores. Recentemente, através de testes clínicos e pre-clínicos, procura-se determinar os impactos de fatores da dieta sobre os fatores epigenéticos envolvidos na prevenção do câncer ou de outras doenças de etiologias complexas.

2.1.3. METILAÇÃO E SILENCIAMENTO GÊNICO

Fenômenos que relacionam a metilação de citosinas com o silenciamento de genes em seqüências duplicadas foram descritos em diferentes organismos (fungos, plantas e animais) e, de modo geral, no silenciamento gênico dependente de homologia ("Homology-dependent gene silencing" – HdGS; MATZKE *et al.*, 1994; MATZKE *et al.*, 2001). O fato de que o tratamento de células cultivadas com o agente hipometilante 5-azacitidina, pode reativar genes de retrovírus ou genes endógenos que foram "silenciados" pela metilação "de novo" das suas regiões reguladoras, forneceram as bases para que Bestor (1996) formulasse a hipótese de que a metilação da citosina é parte de um sistema de defesa do hospedeiro na supressão da transcrição de seqüências de elementos parasitas. A vantagem seletiva de um tal sistema defensivo é óbvia, desde que uma grande parte do genoma eucariótico corresponde a seqüências que são invisíveis, mas que podem provocar mutações ou danos citotóxicos, se puderem proliferar indiscriminadamente. Esta hipótese da defesa genômica requer que a especificidade da ação da metilação seja determinada pelas diferenças estruturais de seqüências particulares dos elementos parasitas. Esta defesa pode agir no momento da invasão do genoma por vírus, por DNA transformante ou por transposição de elementos de DNA endógenos. A ação defensiva pode, também, ser desencadeada por interações de pareamento de elementos repetidos que ocorrem na pré-meiose dos genomas contendo duplicações. Esta hipótese também requer que o aparato de defesa genômica reconheça seqüências específicas e comuns aos elementos invasores. Sabe-se que praticamente todos os intermediários de transposição e de integração viral apresentam certos aspectos estruturais comuns. O reconhecimento e a metilação

"de novo" dos sítios CpG, dentro ou nas proximidades das seqüências, deve garantir que a inativação do elemento invasor (ou transgene) ocorra imediatamente após sua integração (BESTOR e TYCKO, 1996).

2.1. 4. RECOMBINAÇÃO X METILAÇÃO

Todas as etapas do processo de recombinação de eucariotos envolvem as funções de genes que atuam na metilação do DNA, mais do que em qualquer outro processo biológico conhecido. Na recombinação alélica, segundo o Modelo de Holliday (1964, 1975), o DNA heteroduplex da molécula intermediária apresenta vários aspectos comuns que o torna muito vulnerável a metilação "de novo" pois: a) cria diferenças nos sítios hemimetilados dos heteroduplex, que desencadeiam a metilação "de novo", pela atividade da enzima DNA metiltransferase; b) as estruturas preferenciais da ação da DNA metiltransferase são as quatro junções de DNA, na molécula intermediária de Holliday; c) os "mismatches" nas vizinhanças das seqüências de CpG favorecem a metilação "de novo". A exposição destes sítios vulneráveis pode criar uma "engrenagem" de metilação que aumenta de modo desregulado a cada ciclo meiótico.

A metilação do DNA, catalisada por uma família de DNA metiltransferases, é observada nos protistas, plantas, fungos e animais. Ela pode estar envolvida em várias funções, algumas das quais podem coexistir dentro de um mesmo organismo, podendo inibir a iniciação da transcrição, parar a elongação dos transcritos, agir como um sinal de "imprinting" ou suprimir a recombinação homóloga. Com base nisto, sugere-se que a metilação do DNA foi conservada durante a

evolução porque ela fornece possibilidades únicas de participar em vários tipos e funções (COLOT e ROSSIGNOL, 1999; COLOT *et al.*, 1996).

Estas observações permitiram propor uma condição alternativa, onde a metilação é conservada em eucariotos porque ela confere uma vantagem seletiva em prazo longo, fornecendo o único meio de controlar uma variedade de funções. Os mecanismos dependentes da metilação poderiam conferir então, em prazo curto, as vantagens requeridas para se evitar a perda de metilação, por oscilação genética. Tais funções poderiam ser usadas para diferentes fins, dentro e entre as espécies, e poderiam envolver diferentes alvos metilados ou serem efetivas em diferentes tempos do ciclo de vida.

Mesmo sendo uma modificação natural do DNA, a metilação também pode vir a ser perigosa para as células, pois a 5-mC é o maior mutagênico endógeno conhecido e genes supressores de tumores podem ser inativados, por metilação "de novo" das suas regiões promotoras (HENAN *et al.*, 1994).

De modo geral, as 5-mC também podem ser deaminadas resultando em mutação de transição C → T, nos sítios CpG, que é responsável por 1/3 de todas as mutações já descritas em seres humanos (BESTOR *et al.*, 1993). Esta conclusão pode ter outras implicações pois, metilação também afeta recombinação mitótica. Na realidade, recombinação somática é iniciada por quebras acidentais no DNA dupla fita, depois prossegue exatamente como na recombinação meiótica (COLOT *et al.*, 1996).

A possibilidade do processo de metilação suprimir a recombinação mitótica é muito importante em mamíferos. Muitas células de câncer carregam rearranjos no DNA que podem ser causados por recombinação homóloga entre suas seqüências repetidas. O DNA destas seqüências repetidas freqüentemente está

hipometilado nas células de câncer reforçando as evidências do efeito inibitório da metilação sobre a recombinação mitótica (COLOT e ROSSIGNOL, 1999). Uma possibilidade da ação deste mecanismo pode ser a transferência de metilação entre os alelos metilados e os não metilados, através de interações físicas entre as duas moléculas de DNA parentais (MOULTON *et al.*, 1994; MEYER *et al.*, 1993). Desta maneira, a recombinação seria um elemento fundamental para realização desta transferência (HOLLIDAY, 1987; COLOT *et al.*, 1996).

Os mecanismos pelos quais acontece metilação em fenômenos como LOI (“loss of imprinting”), ou paramutação, não são conhecidos. Mas, uma possibilidade é que a metilação seja transferida do alelo metilado para o não metilado, através de interações físicas entre as duas moléculas paternas (MOULTON *et al.*, 1994; MEYER *et al.*, 1993). A molécula intermediária do mecanismo da recombinação é um provável candidato para permitir esta transferência.

Fenômenos epigenéticos, na sua maioria, estão correlacionados a metilação, incluindo-se o “imprinting” genômico de DNA de mamíferos (TILGHMAN, 1999), metilação induzida por seqüências repetidas em fungos, e a regulação de transposons em milho (MEYER *et al.*, 1995). Isto sugere a possibilidade da existência de um mecanismo ancestral comum. Estes exemplos mostram que a natureza desenvolveu múltiplos mecanismos epigenéticos que podem servir como sistemas de autodefesa genômica.

Apesar deste contexto, a função da metilação em organismos eucarióticos ainda não está definida, sendo apresentadas duas hipóteses. A primeira delas sugere que a desmetilação programada e a metilação *de novo* tem papel direto no controle de genes durante o desenvolvimento (HOLLIDAY and PUGH,

1975), inclusive na regulação do crescimento somático. A segunda, que é mais aceita, sugere que a metilação das citosinas faça parte de um sistema de defesa genômica do hospedeiro para inativar sequências parasitas, como elementos transponíveis e DNA proviral (BESTOR, 1990; BESTOR and COXON, 1993; BESTOR and TYCKO, 1996).

Situações de estresse em eucariotos podem funcionar como estímulos para a metilação do DNA (BESTOR and COXON, 1993). Em bactérias há uma extensa gama de sistemas de restrição-modificação (R-M) que sugerem uma possível função na proteção contra infecções por fagos, não excluindo o papel na recombinação genética. Mais recentemente, foi demonstrada a relação entre acetilação de histonas e metilação como fatores que atuam juntos para regulação da expressão gênica (BESTOR, 1998, 1999; NAN *et al.*, 1999).

2. 2. METILAÇÃO ANORMAL DO DNA E CÂNCER.

Padrões de metilação anormais do DNA são freqüentes na maioria dos cânceres, incluindo aqueles de alta incidência nos USA, como o de cólon, de pulmão, de próstata e de mama. Há evidências recentes que sugerem que a dieta poderia ser uma chave reguladora da metilação do DNA podendo determinar uma resposta para os componentes bioativos dos alimentos. Atualmente, tem-se encorajado pesquisas de âmbito internacional, para a elucidação dos mecanismos pelos quais os fatores da dieta influenciam processos epigenéticos e como estes processos atuam na prevenção do câncer. A estratégia tem sido: estudar os componentes bioativos dos alimentos com propriedades preventivas do câncer e o exame dos eventos epigenéticos principais, que influenciam a carcinogênese

(divisão celular, diferenciação e apoptose). Assim, pesquisadores poderão começar a estabelecer as ligações entre o comportamento epigenético, padrão de metilação e incidência de tumores. As informações fornecerão os meios para o desenvolvimento de estratégias de intervenção na dieta para a prevenção do câncer (SINGH *et al.*, 2003).

Câncer é uma manifestação de ambos tipos de eventos anormais: genéticos e epigenéticos. A importância dos eventos epigenéticos é que eles representam o mecanismo pelo qual a função dos genes é seletivamente ativada ou inativada. O processo de metilação do DNA é fundamental neste mecanismo pois modula a expressão dos genes, além de regular a estabilidade cromossômica. Já que os eventos epigenéticos são suscetíveis a mudanças, eles representam alvos excelentes para evidenciar como os fatores ambientais (incluindo os da dieta) podem modificar o risco de câncer e do comportamento dos tumores. Os estudos clínicos e pré-clínicos têm fornecido evidências interessantes de que tanto os nutrientes essenciais, como os não essenciais dos alimentos, estão relacionados aos padrões de metilação do DNA. Há quatro modos pelos quais os nutrientes podem estar inter-relacionados com a metilação do DNA: **a)** o primeiro envolve os nutrientes que fornecem os grupos metil para a formação da S-adenosilmetionina (SAM); **b)** o segundo envolve aqueles nutrientes que podem modificar a utilização dos grupos metil, por processos de mudanças na atividade da DNA-metiltransferase; **c)** o terceiro mecanismo possível inclui os padrões de metilação do DNA que podem influenciar na resposta ao nutriente (WAINFAN *et al.*, 1989; VACHTENHEIN *et al.*, 1994; LU *et al.*, 2000).

2.2.1. HIPOMETILAÇÃO GLOBAL, SEGUIDA DA HIPERMETILAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA SÃO CARACTERÍSTICAS COMUNS A TODAS CÉLULAS DE TUMOR

Hipometilação global do DNA está relacionada à instabilidade cromossômica. Hipermetilação está associada com a inativação de praticamente todas as vias envolvidas no processo do câncer, incluindo o reparo do DNA, regulação do ciclo celular, resposta inflamatória/estresse e apoptose.

Assim, existem evidências de que as variações, do grau ou do sítio da metilação, podem resultar no reparo anormal do DNA e influenciar múltiplos genes (relacionados ao câncer) e assim, influenciar a incidência e o comportamento de tumores. Estresses, incluindo aqueles resultantes da inadequação das dietas, contendo fatores como metionina/colina; folato; zinco e selênio; ingestão excessiva de álcool pode levar a hipometilação global do DNA (WAINFAN *et al.*, 1989; VACHTENHEIM *et al.*, 1994).

2.3. DIETA E METILAÇÃO DO DNA

A soja tem sido usada como alimento funcional para prevenção e tratamento devido a dois de seus componentes: proteínas e isoflavonóides. Administrando-se proteína da soja, na dose média de 25 g/dia, é possível se reduzir o colesterol total, o LDL-colesterol e os triglicerídeos sem alterar o HDL-colesterol. A redução do colesterol total e do LDL-colesterol é proporcional aos níveis iniciais desses lipídios. As proteínas da soja, e/ou os isoflavonóides podem aumentar a reatividade vascular, melhorar a função endotelial e inibir os eventos que levam à

lesão e à formação de trombos, no homem ou no rato. Em 1999, o FDA divulgou documento contendo informações conclusivas de que a proteína da soja, incluída em dieta pobre em gorduras saturadas e em colesterol, pode reduzir risco de doença coronariana, devido à redução do colesterol. Por isto o FDA autorizou as empresas que produzem alimentos à base de soja, indicar esses benefícios nos seus rótulos. A redução do colesterol plasmático, quando produtos de soja são ingeridos, já foi bem comprovada, mas para se demonstrar diminuição da incidência de doenças cardiovasculares e arteroscleróticas, ainda faltam alguns ensaios clínicos mais convincentes (TOSE *et al.*, 2000).

A alimentação tem sido considerada um importante fator de risco para o câncer. Entretanto, alguns dos componentes da soja, dentre os quais se destacam os isoflavonóides, podem exercer efeitos protetores. Estes efeitos têm sido utilizados para justificar a baixa incidência de alguns cânceres em populações do Oriente, em especial o câncer de próstata, de mama e de cólon. Isoflavonóides são fito-estrógenos que possuem semelhança estrutural com os estrógenos endógenos de animais e que apresentam atividades estrogênicas e anti-estrogênicas. Valiosos estudos recentes têm levado à conclusão de que os produtos da soja são capazes de exercer efeitos fisiológicos benéficos, teoricamente relacionados à redução dos riscos de alguns cânceres. Já é possível afirmar que tais produtos podem contribuir para a baixa mortalidade, por câncer, na Ásia; o uso prolongado de alimentação a base de soja e derivados desde a infância, mostrou ser mais eficiente na proteção anticâncer (TAVARES *et al.*, 2000).

2.3.1. A DIETA

O uso contínuo de uma dieta deficiente em colina e em metionina leva a hipometilação e causa carcinomas hepatocelulares em ratos, mesmo na ausência de qualquer carcinógeno exógeno. Paradoxalmente, tanto dieta deficiente, como com excesso de arsênio, também leva a hipometilação global no fígado de rato. Tratamentos com excesso de ácido retinóico também podem levar a hipometilação no fígado e ratos. Hipometilação global ou hipometilação do DNA foi observado clinicamente em DNA linfocítico de indivíduos que consomem folato inadequadamente (ROSS, 2002).

Enquanto as limitações no suprimento de grupos metil parecem ser um mecanismo comum da hipometilação do DNA, há dados disponíveis que sugerem que há outros fatores determinantes da metilação do DNA que podem ser influenciados pelos componentes bioativos dos alimentos, incluindo a atividade da DNA metil transferase (CAI *et al.*, 1998).

A S-adenosil metionina (SAM) e a S-adenosil homocisteína (SAH), como componentes do metabolismo metil são, respectivamente, o substrato e o produto de reações celulares essenciais da metiltransferase. SAM é derivado da transferência de adenosina ATP-dependente, para metionina, via metionina adenosiltransferase, e serve como doador de metil para a maioria das reações de metilação. Receptores celulares de grupos metil incluem fosfolipídios, proteínas histonas, neurotransmissores, RNA e DNA. A formação de SAM requer suprimento contínuo de folato, metionina, colina, vitamina B12, vitamina B6, vitamina B2 e energia do meio extracelular. Polimorfismos nos genes do metabolismo metil da metionina sintase: metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e cistationina beta-

sintase afetam a concentração de SAM e, provavelmente modificam a suscetibilidade ao câncer. Pesquisadores estão freqüentemente explorando a interação entre estes polimorfismos, a dieta e a metilação do DNA.

As DNA metil transferases (Dnmts) são uma família de enzimas que catalizam a transferência dos grupos metil de SAM para os resíduos de citosina no DNA. Isto produz a 5-metilcitosina e SAH (S-adenosil homocisteína). Em células tumorais foi observada atividade de DNA metil transferase maior do que nas células controle. Deficiência crônica de metil na dieta também aumenta a atividade de DNA metil transferase, o que pode representar uma tentativa de compensar o suprimento diminuído de SAM.

Suprimento de nutrientes, parece então ter um papel fundamental na regulação da atividade da DNA metiltransferase (VAN DEN VEYVER, 2002).

Selênio é um elemento traço que é reconhecido como tendo propriedades anticarcinogênicas em potencial. Enquanto o selênio é conhecido por modificar vários aspectos do processo do câncer, ainda não se tem informação de que ele possa causar alterações fenotípicas. Aumento na concentração do selênio inibe a atividade da DNA metil transferase (Dnmt1), *in vitro*. Esses efeitos do selênio, na atividade da Dnmt sugerem que os fatores da dieta que influenciam a utilização de metil, também podem modificar o DNA. Em alguns cânceres, ilhas de CpG nas regiões 5' de genes supressores de tumores estão metilados e suas expressões estão desligadas. Este mecanismo de silenciamento gênico é, conhecido por ser um dos mais importantes mecanismos de inativação de genes supressores de tumores.

A maioria das causas da metilação aberrante do DNA é desconhecida, exceto envelhecimento e inflamação crônica. Sabe-se que há muitos carcinogênicos (agentes químicos) que não causam mutações, mas a maioria deles

causa metilação aberrante do DNA. Sendo assim, é urgente que se estabeleçam testes para detecção de tais tipos de químicos que, sem serem mutagênicos, alteram a expressão dos genes. Metilação do DNA serve como marcador genético nas moléculas de DNA que não pode ser apagado através das divisões celulares. Os autores mediram a fidelidade da herança do estado metilado/não metilado, de um sítio CpG e estão sendo analisadas as possíveis mudanças nesta fidelidade nas células de câncer. Sabe-se que a maquinaria da metilação do DNA deve incluir um certo número de DNA metil transferases, proteínas que dirigem as enzimas para promotores específicos, enzimas modificadoras da cromatina e demetilases (MATO *et al.*, 1997; CAI *et al.*, 1998).

Segundo Szyf (2003) há dados que sugerem que a regulação da metilação poderia inibir a ação de fármacos (que agem na maquinaria da metilação do DNA) os quais, por sua vez, poderiam inibir o câncer *in vitro*, *in vivo* e, em testes clínicos. A compreensão de quais são as funções da maquinaria de metilação do DNA é essencial para o desenho de fármacos inibidores do mecanismo de metilação do DNA. Naquele trabalho, o autor citado acima, discute os possíveis papéis das DNA metiltransferases e das demetilases, na tumorigênese e suas possíveis implicações farmacológicas e terapêuticas da maquinaria da metilação do DNA.

A hipometilação do DNA está tão associada ao câncer quanto a hipermetilação. Mas estes dois tipos de anormalidades epigenéticas parecem afetar diferentes seqüências de DNA. A relação da hipometilação do DNA, com a tumorigênese animal é importante para a terapia do câncer relacionada com a redução da metilação. Induzindo-se, por exemplo, a hipometilação do DNA pode-se ter um efeito anticâncer "short-term". Mas isso poderia também aumentar a velocidade da progressão do tumor nas células de câncer sobreviventes à quimioterapia e

específica para demetilação do DNA (ERLICH, 2002). A empresa EpigenX (USA) desenvolveu, por exemplo, um composto anticâncer (EGX30P) e pesquisas de compostos de segunda geração. O EGX30P é um inibidor fortemente ligado com este novo mecanismo de ação. O instituto Nacional de Câncer selecionou EGX30P para o seu prestigioso RAID (Rapid Access to Intervention Development) Program. Neste programa, o Instituto Nacional do Câncer que está conduzindo estudos pré-clínicos em animais, verificou que este produto retarda o crescimento das células de câncer em cultura e causa demetilação geral do DNA, revertendo assim, a expressão dos genes supressores de tumores e do reparo do DNA. Como este agente atua no mecanismo envolvido em vários cânceres relacionados com a metilação, a empresa acredita que esta estratégia será efetiva em uma grande porcentagem de cânceres, desde os seus estágios mais iniciais (SADO *et al.*, 2000).

2. 4. METILAÇÃO DO DNA É ALTAMENTE MUTAGÊNICO

2.4.1. OS RESÍDUOS DE 5-METIL CITOSINA, NO DNA, SÃO ALVOS PARA A MUTAGÊNESE DE TRANSIÇÃO

Vários estudos têm mostrado que: 1) há mudanças estruturais no DNA, induzidas por metilação; 2) uma alta porcentagem de mutações em humanos é resultado de transição de bases, CG para AT; 3) há diferenças nas suscetibilidades a deaminação não enzimática entre pares de bases GC e GmC (DAVIS *et al.*, 1998).

Entretanto, pesquisas da estabilidade química envolvem, necessariamente condições não fisiológicas para análise química da deaminação. Neste trabalho, os autores comparam as taxas de mutagênese induzida pela

deaminação entre um par de bases GC e GmC, quando ambos estão presentes em um duplex de DNA incubado a 37 °C e pH 7,4, dentro de idênticas seqüências contextos, em um alvo mutacional natural. Sob estas condições a taxa de deaminação espontânea no GmC excedeu àquela de GC por mais de 21 vezes. Os dados implicam na estabilidade, através da deaminação, como o principal fator causal, relacionando a metilação das citosinas do DNA com a mutagênese (VAN DER VEYVER, 2002).

Citosinas metiladas revelaram ser "hot-spots" para substituições de bases em *E. coli* e quando estas mesmas citosinas não estão metiladas, desaparecem os ALVOS ("hot-spots"). Subseqüentemente a análise de mutações de transição em vertebrados também mostrou uma correlação com metilação nos sítios CpG. Os produtos da mutação estão especificamente associados com transições C → T ou G → A. Vários pesquisadores propuseram que estas mutações são o resultado combinado da deaminação espontânea combinada da 5mC para timina e reparo lento do par errado G - T, em relação aos pares errados G - U que surgem da deaminação da citosina (BIRD, 1986).

Embora a 5mC corresponda a menos de 1% das bases do DNA humano, mutações de ponto levando às desordens genéticas ou câncer estão relacionadas à substituição de base nas 5mC. Estas transições foram encontradas nas formas mutantes do fator IX, no receptor humano LDL, na proteína quinase dependente de AMPc e no produto gênico do supressor de tumor (JONES, 1992). 5mC em DNAss (fita simples) mostrou ser mais suscetível a deaminação pelo calor do que as citosinas normais. Estima-se que a meia vida da citosina em ssDNA seja de 200 anos e de dsDNA seja de 30.000 anos (ERLICH *et al.*, 2002).

2.5. METILAÇÃO E CROSSING-OVER

Os transgenes, infelizmente, ou felizmente, têm vida efêmera entre os eucariotos, principalmente devido aos mecanismos de defesa genômica que desencadeiam processos de silenciamento de segmentos de DNA exógenos. Os mecanismos RIP ("repeat induced point mutation"), MIP ("mutation induced preiotically"), GIS ("gene inactivation system", CASTRO-PRADO e ZUCCHI, 1996), descritos em *N. crassa*, *A. immersus* e *A. nidulans*, respectivamente, apresentam muitas características comuns ao mecanismo RIGS ("repeat induced gene silencing"; MATZKE e MATZKE, 1995; MATZKE *et al.*, 1994), descrito em plantas. Este último mecanismo é tão eficiente que multicópias de transgenes induzem o seu silenciamento mútuo e até mesmo o silenciamento de outras seqüências homólogas, residentes.

Este fato incontestável sugere que tais mecanismos de inativação de genes têm um papel fundamental na manutenção do genoma original. Considerado por este ângulo, o crossing-over, mesmo entre seqüências homólogas de genes ligados, faz parte do aparato que deve acionar os mecanismos de defesa genômica onde, as características mais adequadas para a sobrevivência da célula deverão prevalecer. Um estudo detalhado biológico e molecular, dos recombinantes (com crossing-over) deverá ser feito. Para isto deverão ser selecionados produtos da progênie apresentando evidências da ocorrência de crossing-over mitótico ou meiótico, de crossing-over não recíproco (que gera os insertos dos transgenes), de transposições, e de retroposições de segmentos de DNA. O papel da metilação do DNA nestes processos é interessante, principalmente, se a alteração do padrão de

metilação do DNA altera também a eficiência das “recombinases” e das enzimas participantes do processo de reparo.

Exames de células germinativas purificadas de camundongos machos mostraram que, tanto a proteína DNA-metiltransferase, como o RNA de 5,2 Kb, desta enzima foram encontrados em todos os tipos de células germinativas, exceto no paquíteno dos espermátócitos. Estes espermátócitos mostraram ausência da DNA-metiltransferase, mas continham RNA de 6,2 Kb não associado com polirribossomos. É no estágio do paquíteno da meiose I que ocorre a maioria dos eventos de crossing-over. Os RNAm ubíquos, de 5,2 KB da enzima DNA metiltransferase, reaparecem no final da fase de crossing-over. Estes fatos sugerem que os intermediários meióticos de recombinação estão protegidos da metilação “*de novo*” pela repressão da síntese da DNA-metiltransferase. Isto é feito através de um mecanismo pós-transcricional que promove a produção de um RNA transcrito maior (6,2 KB) que não é traduzido, pois não se associa aos polirribossomos (in BESTOR e TYCKO, 1996).

Seqüências exógenas repetidas, que já foram submetidas às modificações por RIP, são freqüentemente metiladas *de novo* em células assexuadas de *Neurospora*. Já se verificou que os fungos são organismos atraentes para estudos da manutenção da metilação *de novo*, dos seus efeitos biológicos e também de outros mecanismos epigenéticos.

2.6. LINHAGENS DE FUNGOS DIPLÓIDES, INDICADORAS DE EFEITOS CARCINOGENÉTICOS AMBIENTAIS

Existem atualmente cerca de 11 milhões de substâncias químicas, sendo que apenas 60% possuem estudos completos de seus efeitos sobre o organismo humano (in PIRES e ZUCCHI, 1987). Inclui-se nestas estatísticas a grande maioria de produtos químicos utilizados como insumos nas atividades de manufatura. Suspeita-se que, grande parte desses agentes químicos possua algum efeito direto sobre o material genético, sugerindo um potencial genotóxico.

O emprego de modelos biológicos para estudos de carcinogênese, de toxicidade e dos diversos eventos que afetam diretamente o DNA, tem sido uma estratégia rotineira. Entretanto, não há sistemas biológicos disponíveis para detecção de carcinogenicidade baseado em alteração de metilação do DNA. Os testes de recombinação que empregam *A. nidulans* permitem avaliar vários tipos de danos genéticos, como mutações pontuais e aneuploidias (KAUFER, 1982).

Testes de genotoxicidade são considerados provas complementares dentro da bateria de testes que buscam elucidar os efeitos específicos no genoma, como, por exemplo, a homozigotização de genes recessivos. O uso deste fungo justifica-se por ser de ciclo vital rápido, além de crescer em meios de composição simples (ZUCCHI e PIRES, 1997).

2.6.1. VANTAGENS DE LINHAGENS ESPECIAIS DE *A. NIDULANS* PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL RECOMBINAGÊNICO/CARCINOGÊNICO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

O crossing-over mitótico, descrito inicialmente em *Drosophila melanogaster*, desempenha importante função na detecção de mutações recessivas, em células diplóides heterozigotas. Isto é possível através da obtenção de células diplóides, homozigotas para genes localizados em posições distais ao sítio de ocorrência do crossing-over (CASTRO-PRADO e ZUCCHI 1991 a; PIRES e ZUCCHI 1994). A perda de heterozigosidade, induzida pela troca de segmentos entre cromossomos homólogos no estágio G2 do ciclo celular, pode ocorrer através da segregação de cromátides recombinantes para pólos opostos. Em *D. melanogaster*, este tipo de segregação resulta na segregação de ambas cromátides recombinantes para o mesmo polo mitótico.

O crossing-over mitótico foi também observado em vários outros organismos, tais como *A. nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Schizophyllum commune*, *Verticillium albo-atrum*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre outros, sendo atualmente considerado como um processo de ampla atuação em células diplóides (KUNZ e HAYNES 1981).

A segregação das cromátides irmãs durante a mitose consiste numa etapa vital do processo de divisão celular, onde cada célula filha deve receber uma cópia de cada cromátide. Acredita-se que a orientação de cada par de cromátides irmãs, na placa mitótica, seja um processo independente do par-homólogo, entretanto, neste momento, cromátides homólogas podem estabelecer contatos uma com a outra, ou mesmo quebras cromossômicas podem ocorrer, desencadeando o

processo de permuta mitótica. Este processo de trocas permitirá a expressão de genes recessivos, previamente mascarados pela presença do alelo dominante. A homozigose de genes recessivos, induzida pelo crossing-over mitótico, pode ter efeitos carcinogênicos (LAIRD e JAENISCH, 1996). A tumorigênese depende de três importantes etapas: iniciação, promoção e progressão, durante as quais alterações genéticas sucessivas ocorrem, resultando na formação da massa tumoral. Células *iniciadas* podem ser aquelas portadoras de mutações autossômicas recessivas, as quais podem se expressar mediante a segregação mitótica aberrante induzida por um *promotor*. Desta forma, a perda de heterozigosidade induzida pelo crossing-over mitótico ocupa posição de destaque no processo de carcinogenicidade, agindo como um evento *promotor*, reduzindo a heterozigosidade constitucional de genes supressores de tumores.

O estudo de substâncias químicas com potencial recombinagênico assume, portanto, importância crucial na detecção substâncias que, eventualmente, possam atuar como *promotoras* de neoplasias. Vários agentes físicos e químicos foram, de fato, descritos como indutores de permutas mitóticas em células eucariotas. Dentre estes podemos citar o efeito da luz ultravioleta sobre o DNA e a produção de quebras cromossômicas induzidas pela radiação ionizante, ambos efeitos resultando em estímulos ao evento de trocas mitóticas. Agentes alquilantes e inibidores da síntese de DNA, tais como 5-fluorodeoxyuridine, mitomycin C and bleomycin, foram também caracterizados como indutores de crossing-over mitótico. Entre os fungos filamentosos, o processo de crossing-over mitótico não parece ser essencialmente diferente do crossing-over meiótico, exceto em relação a sua baixa frequência (NISHIMURA M. *et al.*, 1985). O ciclo parassexual de *A. nidulans* tem sido amplamente utilizado na detecção do potencial recombinagênico de substâncias

químicas diversas, isto porque, como citado anteriormente, a recombinação pode atuar como um agente promotor da carcinogênese (KÄFER *et al.*, 1976).

As primeiras indicações de que o aumento na incidência de doenças graves, como o câncer, estava relacionado à exposição aguda a certas substâncias químicas, apareceram na década de 70. Posteriormente, diversas análises foram conduzidas para vários compostos químicos e o processo de carcinogênese tornou-se objeto de experimentação. Sendo assim, os processos de reparo de DNA, replicação e recombinação passaram a se revestir de especial importância quanto ao estudo de seus mecanismos e vias de funcionamento. Diversos testes foram desenvolvidos para a detecção de mutações: de aumento da frequência de recombinação mitótica, de amplificação gênica, de quebras no DNA, ligações extras entre bases de uma das cadeias de DNA (como dímeros de pirimidina), de aberrações cromossômicas, de alquilações e desaminações. Entre os testes mais importantes encontram-se: o teste de Ames (e variantes), usado na determinação de mutagênese (reversão da *Salmonella typhimurium his*), revertantes de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, *Neurospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae* (detecção de crossing-over e conversão gênica, aneuploidias, não disjunção mitótica) entre outros testes citogenéticos (ZUCCHI e PIREZ, 1997). Os testes de mutagênese e recombinação que empregam *A. nidulans* permitem avaliar vários tipos de danos genéticos, como mutações pontuais e aneuploidias (KÄFER, *et al.*, 1982).

Fármacos com efeitos sobre a síntese de DNA ou sobre a síntese de RNA dependente de DNA, tais como norfloxacin e actinomicina D, bem como, substâncias utilizadas como defensivos agrícolas, entre os quais podemos citar o benomil [metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato], botran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) e cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno), foram testados em

linhagens diplóides de *A. nidulans* quanto a seus prováveis efeitos sobre o crossing-over mitótico. Os estudos realizados permitiram verificar que a atividade recombinagênica destas substâncias poderia ser decorrente de três processos distintos: não disjunção mitótica, crossing-over mitótico e quebras cromossômicas. PIRES e ZUCCHI (1994) descreveram uma metodologia específica para determinação da genotoxicidade de agentes físicos e químicos, através da avaliação da indução de homozigotização de genes recessivos por estes agentes.

2.7. O BENZENO COMO PODEROSO AGENTE GENOTÓXICO E CARCINOGÊNICO

Neste estudo, usamos o agente carcinogênico Benzeno, na forma de vapor, segundo protocolo de Zucchi *et al* (2005). Vários tipos de testes foram desenvolvidos para avaliar os riscos de genotoxicidade do benzeno. São testes que tratam do monitoramento humano ao risco de mutagênese ocupacional e/ou ambiental e avaliam a incidência de mutações, produzidas *in vivo*. Pessoas que se submetem a esse tipo de teste devem ser aquelas que trabalham com energia nuclear, radiação, produtos do petróleo, agrotóxicos, fármacos, etc., ou são pessoas que vivem em ambientes poluídos, próximos a fábricas de material que apresentam risco ambiental. No caso de pessoas que trabalham em indústrias petroquímicas o procedimento consiste do cultivo de linfócitos dessas pessoas e da observação da sua primeira divisão para a verificação da ocorrência de aberrações. Após sua primeira divisão, são analisadas para a verificação da frequência de micronúcleos. (FENECH e RINALDI, 1995; ZUCCHI *et al.*, 2005)

O benzeno é muito usado em indústrias. Embora nos locais de trabalho, a exposição dos trabalhadores ao benzeno tem sido limitada pelos regulamentos de biossegurança (RUNION e SCOTT, 1985), o benzeno ainda continua a ser um poluente ambiental importante como componente da gasolina. O benzeno está presente, em baixa concentração, na fumaça do cigarro e na fumaça de cocção (LOFROTH *et al.*, 1991). A exposição de trabalhadores, ao benzeno leva à anemia aplástica e à leucemia mielogênica, em humanos, e às múltiplas formas de câncer dos roedores (AKSOY, 1989; HUFF *et al.*, 1989). Tuo *et al.* (1996), usando a técnica da SCGE (Teste Cometa) e comparando seus resultados com outros estudos de tratamento com benzeno, por outros métodos, concluiu que, o teste Cometa é bastante sensível para se detectar danos no DNA induzidos pelo benzeno e que o CYP2E1 contribuiu, pelo menos em parte para a formação dos cometas induzidos pelos metabólitos, nas células selecionadas.

Assim, o benzeno é um contaminante ambiental ubíquo que é hematotóxico, clastogênico e leucogênico para seres humanos e animais e que produz toxicidade à medula óssea. No entanto, os mecanismos pelos quais o benzeno leva a vários tipos de câncer, não estão bem claros. Em estudos com animais já se tem notícia de que o metabolismo hepático tem importante papel na toxicidade. O primeiro passo no metabolismo hepático que tem importante papel na toxicidade é a atividade do CYP2E1 e outras isoenzimas do citocromo P450, leva à produção de um intermediário reativo, o óxido de benzeno (BO). O BO pode produzir adutos de proteínas e do DNA do sangue, da medula óssea e de outros tecidos. Entretanto há poucas informações do mecanismo que leva a carcinogenicidade. No trabalho de Lindstrom *et al.* (1997), com o auxílio de cromatografia de gás-espectrometria de massa, conseguiu-se medir BO no sangue de ratos F-344, tanto *in*

vitro, como após 24 h após administração oral de benzeno. O óxido do benzeno (BO) mostrou-se relativamente estável no sangue de ratos, a 37°C (meia-vida estimada em 7,9 min) e, depois de uma única dose de 400 mg benzeno/kg de peso corporal, apareceu numa concentração de 8,5 ng/mL, medida por 9 h. Estimou-se que 4,3% da dose de benzeno metabolizada foi liberado como BO, do fígado para o sangue.

Isto confirmou que BO é formado pelo metabolismo do benzeno, e é suficientemente estável para ser distribuído através de todo corpo, em níveis que são, provavelmente maiores do que os níveis de outros metabólitos eletrofílicos do benzeno. Com uma meia vida de cerca de 8 min no sangue de ratos, o BO pode circular por todo o corpo após ser formado no fígado. Assim, ele é capaz de formar adutos com várias macromoléculas, incluindo DNA e proteínas. Os resultados sugerem também que BO pode ser formado *in situ* nos tecidos. Um aduto de DNA, produzido pelo BO, resulta na N7-fenilguanina que foi observada na urina de ratos tratados com benzeno e no único bio-ensaio para câncer de pulmão. BO também produziu tumores de pulmão após injeções (i. p.) em ratos recém-nascidos. Trabalhos mostraram que uma proteína com adutos de BO (S-fenilcisteína, SPC), está presente na hemoglobina do sangue, na albumina e na medula óssea de ratos e camundongos, também apareceu na hemoglobina e no soro-albumina de trabalhadores expostos ao benzeno (LINDSTROM *et al.*, 1997).

A ligação covalente de BO *in vivo* mostrou linearidade nas relações entre adutos de DNA e doses altas de exposições (10^5 - 10^8 vezes), mesmo com baixas doses de mutagênicos como a aflatoxina B1 e o benzeno (CREECK *et al.*, 1997). Entretanto esta linearidade não implica em um aumento linear de risco de câncer.

Os efeitos genotóxicos do benzeno em células de pulmão de ratos expostos a doses agudas únicas, por inalação, foram estimados pela análise citogenética de micronúcleos em culturas primárias de fibroblastos de pulmão. Camundongos expostos (apenas nariz) a 1000 ppm por 30 ou 60 min, ou a 3.500 ppm por 30 min, foram sacrificados depois de 24 h da exposição. Lâminas foram preparadas com os fibroblastos e os micronúcleos foram contados nas células binucleadas. Os mecanismos de indução de micronúcleos foram caracterizados por coloração imunofluorescente das proteínas do cinetócoro que distinguem micronúcleos que tiveram perda de cromossomos (aneuploidias), daqueles que tiveram quebras cromossômicas (aberrações cromossômicas). A frequência de micronúcleos totais aumentou 4 vezes em camundongos tratados com benzeno, comparados com as frequências de micronúcleos dos camundongos não tratados. Estes efeitos não dependeram do tempo ou dose de exposição. Tanto as perdas de cromossomos, como a quebra de cromossomos, contribuíram para a formação de micronúcleos, sugerindo que a aneuploidia pode ser um importante evento genotóxico associado com a carcinogenicidade do benzeno.

Mullin, *et al.* (1998) apresentaram resultados convincentes de que o benzeno inalado (forma de vapor) é um mutagênico para tecidos pulmonares de camundongo. Investigaram-se os efeitos de vapores do benzeno porque a maior via de entrada de ar poluído, e de benzeno, no organismo é via pulmões, ou via benzeno volátil.

Foi mostrado que o benzeno é o indutor mais potente de danos cromossômicos. O trabalho de Ress *et al.* (2002) mostrou que o DAAB (diazaminobenzeno) também é um potente indutor de micronúcleos em medula

óssea de camundongos e, esta sua atividade, parece estar intimamente relacionada à atividade do benzeno que é um de seus metabólitos primários.

Segundo Zucchi *et al.*, (2005), em linhagens de células eucarióticas diplóides, o benzeno pode alterar o estado de metilação do DNA em doses submutagênicas.

2. 8. PRODUTOS DE BIOTECNOLOGIA E DETECÇÃO RÁPIDA DO POTENCIAL GENOTÓXICO / ANTIGENOTÓXICO

Quanto à promoção de danos no DNA de células somáticas ou germinativas, o potencial genotóxico dos produtos de Biotecnologia, em geral, proteínas recombinantes de alto peso molecular, não podem ser comparados à eficiência e genotoxicidade dos produtos químicos, de baixo peso molecular. Reações eletrofílicas são difíceis de se visualizar, no entanto, elas são detectadas através de reações indiretas, via metabolismo de DNA e regulação do crescimento.

2. 8. 1. TESTES DE ANTIGENOTOXICIDADE

A capacidade dos testes padrões de mutagenicidade para reconhecer tais modos de ação, parece duvidosa. Por isso, estratégias caso a caso, precisam ser usadas, bem como precisam ser levadas em consideração todas as informações importantes e relacionadas aos seus efeitos biológicos. Entre os exemplos clássicos que envolvem componentes protetores da dieta animal mencionamos as taxas de câncer de seio entre as Asiáticas-Americanas, que são menores do que aquelas da população de brancos dos Estados Unidos, mas

maiores do que as taxas prevalentes na Ásia. O alto consumo de soja na Ásia e o baixo consumo pelas Asiáticas-Americanas, nos Estados Unidos, podem explicar, parcialmente, o aumento da taxa de câncer de seio entre as Asiáticas-Americanas (WU *et al.*, 1998). Os isoflavonóides da soja, como a genisteína e a daidzeína, são considerados fatores importantes que contribuem para o efeito anticâncer da soja, devido à similaridade da estrutura química destes compostos com o estradiol (LEE *et al.*, 1991; ZHENG *et al.*, 1999). Há várias evidências que sugerem que os flavonóides, incluindo a genisteína realmente detêm a evolução do câncer. Genisteína na dieta muda o padrão de metilação do DNA em tecido da próstata de camundongo C57BL/6J. Depois do seqüenciamento, determinou-se que o consumo de genisteína leva a hipermetilação de quatro ilhas de CpG específicas.

Foram também verificadas as atividades antimutagênicas /antigenotóxicas do chá verde. Os mecanismos de antimutagênese e de anticarcinogênese do polifenol do chá sugerem que a inibição de tumores pode ser devido a mecanismos intra e extracelulares (KURODA e HARA, 1999).

Estes achados impõem que produtos de plantas transgênicas precisam também ser testados quanto às suas propriedades antigenotóxicas /anticarcinogênicas, para compará-las com as mesmas propriedades dos produtos não transgênicos a para que estas propriedades benéficas não se percam durante o processo de transgenia.

Os resultados de Shinmoto *et al.* (1995 a,b) examinaram a mutagenicidade de extratos de tomate transgênico (suco e extrato etanólico) que foram obtidos pela transfecção de um gene codificando a proteína da capa protéica do vírus do mosaico do tabaco. O teste aplicado foi o *Umu-test*, feito com *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK 1002 e ele não evidenciou mutagenicidade detectável.

2. 9. ANÁLISES MOLECULARES

2. 9. 1. ANÁLISES MOLECULARES: AVALIAÇÃO DE FENÔMENOS EPIGENÉTICOS EM LINHAGENS DIPLÓIDES DE *A. nidulans*

O genoma de *A. nidulans* foi estimado em aproximadamente 31 Mb. O gênero possui 8 marcadores cromossômicos contendo entre 11.000 – 12.000 genes. Aproximadamente 900 genes foram identificados por marcadores convencionais, sendo que 432 tiveram seus *loci* mapeados e 254 clonados e seqüenciados (Fungal Genome Initiative).

Uma abordagem rápida e informativa sobre alteração genética comparativa, pode ser fornecida pela utilização da técnica de amplificação ao acaso de polimorfismos de DNA (RAPD), aplicada aos diplóides originais e aos diplóides recombinantes após tratamentos com agentes genotóxicos e antígenotóxicos. As diferenças significativas entre os índices de homozigotização (HI) observadas nas linhagens diplóides, tratadas e não tratadas, sugeriram variabilidade nos níveis dos danos induzidos no genoma do fungo. A técnica do RAPD pode fornecer informações valiosas, permitindo uma ampla cobertura dos genomas, com a utilização de pequenos “primers” de seqüências arbitrárias, que eliminam a necessidade do conhecimento prévio das seqüências (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

RAPD é um método baseado na polimerização de DNA que possibilita revelar pequenas diferenças entre organismos intimamente relacionados. Uma ferramenta rápida e de alto valor informativo é a técnica de Amplificação de Segmentos de DNA ao Acaso (RAPD). Esta técnica permite analisar a estrutura e

diversidade genética entre populações e o polimorfismo molecular. Este polimorfismo é de natureza binária, uma vez que a técnica realiza amplificação arbitrária de segmentos do DNA através de seqüências iniciadoras (primers) em reação em cadeia de polimerase (PCR), sendo que as evidências experimentais indicam que a mutação em apenas um par de bases acarreta a não complementaridade do primer gerando perfis diferenciados. Deste modo, pode-se detectar a ausência ou presença de um segmento amplificado. RAPD é um marcador genético dominante, pois só realiza amplificação no alelo dominante, não sendo possível à distinção entre as classes de alelos dominantes homozigotos e heterozigotos. A técnica faz uma cobertura ampla do genoma aliada à simplicidade e rapidez na geração de dados, além de ter alta sensibilidade na detecção de polimorfismo ao nível de DNA. Esta ferramenta presta-se à detecção da variabilidade em colônias recombinantes (com crossing-over). Alterações dos padrões de metilação do DNA também podem ser detectadas desta forma.

2. 9. 2. SELEÇÃO DE “PRIMERS” ALEATÓRIOS

O Laboratório de Biotecnologia Genômica da Universidade Católica de Brasília, possui um banco de 40 “primers” aleatórios que foram testados em *A. nidulans*. Deste conjunto de “primers” foram selecionados 7 “primers” que inicialmente apresentaram alto polimorfismo em RAPD. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela GibcoBRL diluídos a 10 μ M e a seqüência de bases encontra-se na **Tabela 1.**

Tabela 1. Seqüências nucleotídicas dos primers usados em RAPD do *A. nidulans*

Primers	Seqüências (5' - 3')
OPC20	ACT TCG CCA C
OPG10	AGG GCC GTC T
OPJ20	AAG CGG CCT C
OPK10	GTG CAA CGT G
OPM20	AGG TCT TGG G
OPQ20	ACA CAC GTC G
OPV10	GGA CCT GCT G

Primers sintetizados por Life Technologies Brasil Ltda. 10 mM da seqüência original do OPERON Technologies.

3.OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O principal objetivo é o desenvolvimento de teste rápido, sensível e pouco dispendioso que sirva para avaliar, tanto o potencial genotóxico de agentes ambientais como também o potencial antigenotóxico (anticarcinogênico) de fatores da dieta.

4.*H*IPÓTESE DE *T*RABALHO

4. HIPÓTESE DE TRABALHO

Doses submutagênicas de agentes genotóxicos ambientais podem infringir danos no DNA de eucariotos. Estes danos, embora não correspondam a mutações verdadeiras, são hereditários e relativamente estáveis durante as divisões celulares. Apesar disso, estes danos são transitórios e podem ser revertidos por agentes exógenos, hipometilantes do DNA, ou por mecanismos que estimulam um novo mecanismo de reparo.

Sugerimos:

- a) que os danos correspondam a sítios de pesada metilação do DNA que silenciam genes por inibirem a transcrição e,
- b) que genes silenciados possam ser reativados por componentes da dieta, com potencial antigenotóxico.

Como há bases suficientes para apoiar a hipótese de que a metilação do DNA está envolvida na expressão e na regulação de genes através de mecanismos epigenéticos, a atual pesquisa pretende esclarecer como os fatores ambientais podem influenciar os processos relacionados a metilação do DNA, a demetilação e a recombinação mitótica do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*.

Este trabalho foi redigido de acordo com as “**Diretrizes para apresentação de Teses e Dissertações do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2005**”.

5.*M*ATERIAL E *M*ÉTODO

5. MATERIAL E MÉTODOS

5. 1. LINHAGENS HAPLÓIDES ORIGINAIS E MUTANTES

5. 1. 1. LINHAGENS

Linhagens haplóides de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, originárias de Glasgow, foram obtidas a partir dos estoques de Utrecht, Holanda. De acordo com a nomenclatura proposta por Clutterbuck (1993), as linhagens haplóides UT448, UT196, UT184 e o mutante *Dp* (II-I) – Este mutante foi obtido pelo tratamento da linhagem UT448 com *N*-metil-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidina (ZUCCHI, 1990 a). Os mapas parciais das linhagens haplóides foram descritos por Clutterbuck (1993), e Pires e Zucchi (1998). Os *loci* mutantes são descritos como: **UT448** - *wA2* (II), conídios brancos: *riboA1*, *pabaA124*, *biA1* (I), com requerimentos para riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico e biotina, respectivamente; *acrA1* (II) resistente a acriflavina. **UT196** – *yA2* (I), conídios amarelos; *metA17* (II); *piroA4* (IV); com requerimentos para metionina e piridoxina. **UT184** - *chaA1* (VIII), conídios cor “chartreuse”; *piroA4* (IV); *sB3* (VI); *nicB8* (VII); *riboB2* (VIII), com requerimentos para piridoxina, tiosulfato de sódio, ácido nicotínico e riboflavina, respectivamente; *galA1* (III); *facA303* (V); *lacA1* (VI), com inabilidade de utilizar galactose, acetato e lactose como únicas fontes de carbono, respectivamente; *sulA1* (I); *acrA1* (II), resistente à sulfanilamida e acriflavina, respectivamente (Figuras 1A e 1B). *Dp* (II-I) - *wA2* (II), conídios brancos; *riboA1*, *uvsA1*, *det*, *pabaA124*, *biA1*(I), com requerimentos para riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico e biotina, respectivamente; *uvsA1*, *acrA1* (II), com sensibilidade a UV e resistente a acriflavina, respectivamente. Apresenta morfologia deteriorada e com pouca conidiação (Figura 1B). Linhagens diplóides UT448//UT184

e *Dp* (II-I)//UT184 (Diagrama 1). – Foram preparadas segundo metodologia de Roper (1952). Os alelos mutantes foram localizados nos seis grupos de ligação pela haploidização mitótica (FORBES, 1959) facilitado pelo tratamento com *p*-fluorfenilalanina (*p*FA) (LHOAS, 1961; MORPURGO, 1961). A haploidização dos diplóides foi obtida espontaneamente em meio completo ou induzida em MC contendo o agente haploidizante *p*FA. Frequências de recombinação (FR), entre dois marcadores ligados ou não, foram determinadas em porcentagem.

Diagrama 1. Mapa parcial da linhagem diplóide *Dp* II-I//UT184. I a VIII representam os 08 grupos de ligação das linhagens diplóides de *A. nidulans*, usadas; os círculos representam os centrômeros. As posições dos *loci* estão relativamente apresentadas. Os marcadores genéticos apresentados na parte superior de cada cromossomo, são da linhagem parental *Dp* II-I, e aqueles apresentados sob as linhas representando os cromossomos, são da outra linhagem parental, UT448. Os marcadores genéticos *uvs* e *det*, no cromossomo I, são resultados de rearranjos no DNA, depois da inserção de um segmento duplicado transposto do cromossomo II para o I.

Figura 1. Morfologia das linhagens haplóides. A cor dos conídios em *Aspergillus nidulans* depende dos pigmentos produzidos pelo ascósporo maduro e envolve a expressão de pelo menos dois genes: *yA* and *wA* (in ZUCCHI, 1996). O produto de *yA* é a p-difenoloxidase, ou lacase, que transforma o pigmento amarelo precursor em pigmento verde (*y+*). O gene *wA* codifica uma policetônico sintase; mutações nesse gene resultam em linhagens com esporos brancos (MAYORGA and TIMBERLAKE, 1992). WATANABE *et al.*, (1999) verificaram que o gene *wA* codifica uma sintase policetônica de naftopirona YWA1. Além disso revisaram a sequência do gene *wA* e verificaram que seu produto era o novo naftopirona (YWA1), em vez da citreoisocumarina e seus derivados (MAYORGA and TIMBERLAKE, 1990; 1992; WATANABE *et al.*, 1998). Este novo composto (YWA1) é considerado um intermediário do pigmento do esporo de *A. nidulans*. A cor dos conídios depende do alelo *w⁺* presente no cromossomo II. Conídios verdes ou amarelos dependem da presença dos alelos *y⁺* ou *y*, respectivamente, no cromossomo I. Desse modo, genótipos *y⁺w⁺*, *y⁺w*, *yw⁺* and *yw* resultam em conídios com fenótipos verde, branco, amarelo e branco, respectivamente (MAYORGA and TIMBERLAKE, 1990; TILBURN *et al.*, 1990; TIMBERLAKE and MARSHALL, 1988).

5.1.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Meio Completo (MC) e meio mínimo (MM) foram descritos por Zucchi, (1990 a, b), com base em Van de Vate e Jansen, 1978. Meio Seletivo (SM) consta de MM suplementado de acordo com os requerimentos das linhagens usadas. Meio sólido contém 1.5% Agar. Solução Salina: 8,5 g NaCl em 1000 - de água destilada. Solução de 5-azacitidina: ($C_8H_{12}N_4O_5$ - peso molecular = 244,2 - Sigma Chemical Company nº A 2385) 50 mg de 5-azacitidina em 10 mL de tampão fosfato 1M pH =

7,4. Usar 7,3 mL da solução em 50 mL de MM. Para os experimentos de demetilação, 5-azacitidina é adicionada ao MC numa concentração final de 300 μ M (BULL and WOOTON, 1984).

Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO *et al.*, 1953): nitrato de sódio (6,0 g); sulfato de magnésio heptahidratado (0,52 g); cloreto de potássio (0,52 g); fosfato di-hidrogenado de potássio (1,52 g); sulfato de ferro heptahidratado (1,0 mg); sulfato de zinco heptahidratado (1,0 mg); glicose (10,0 g); água destilada q.s.p.(1000 mL). Acertar o pH para 6,0. Para meio sólido, acrescentar 12,0 g de Agar. **Meio Completo (MC)** (Jansen, 1970): peptona (2,0 g); casaminoácidos (1,0 g); extrato de leveduras (0,5 g); solução de vitaminas (1,0 mL); Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras (2,5 mL); meio mínimo líquido q.s.p (1000 mL). Acertar o pH para 6,0. **Meio Seletivo (SM)**. 200 mL de MM sólido adicionado de: 1 μ g/mL riboflavin, 0.7 μ g/mL *p*-aminobenzoic acid, 0.02 μ g/mL biotina, 0.5 μ g/mL pyridoxine, 1 μ g/mL nicotinamide, and 1.24 mg/mL sodium thiosulphate. **Meios para análises**: SM desprovido, individualmente, de riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico, biotina, pyridoxina, nicotinamida e tiosulfato de sódio. Utilização de fontes de Carbono, também foram determinadas para cada segregante haplóide: SM sem glicose adicionado com lactose (10 mg/mL), galactose (10 mg/mL) ou acetato de sódio (12 mg/mL).

Meios soja, MSo e MSoT: são compostos de MM sólido adicionado com 20 g/L de soja convencional (MSo) ou de soja contendo 25% de soja resistente ao herbicida glifosato (MSoT), respectivamente, ambas cozidas e trituradas. As amostras de soja foram uma cortesia do Dr. Itamar Soares de Melo (EMBRAPA AMBIENTAL – Jaguariúna – SP) e analisadas pela Empresa SGS do Brasil LTDA (Vide laudo das análises, no apêndice).

Solução de Vitaminas: solução de Vitaminas (VAN DE VATE e JANSEN, 1978): 10 mg/L de biotina; 250,0 mg/L de piridoxina; 250,0 mg/L de ácido p-aminobenzóico; 250,0 mg/L de ácido fólico; 500,0 mg/L de nicotinamida; 500,0 mg/L de riboflavina; 1,0 g/L de ácido pantotênico; 1,0 g/L de cloreto de colina; 2,0 g/L de β -meso-inositol; 250 mg/L de tiamina; completar o volume para 1 litro com água destilada. A solução é esterilizada em banho-maria, sob vapor fluente, por 20 minutos e conservada em frasco âmbar a 4 °C contendo 1,0 mL de clorofórmio.

Hidrolisado de ácido Nucléico de Levedura: mistura-se 2,0 g de ácido nucléico de leveduras com 15,0 mL de solução 1N NaOH e 2,0 g de ácido nucléico de leveduras com 15,0 mL de solução 1N de HCl. As soluções são aquecidas em banho-maria por 20 minutos, misturadas e o pH ajustado em 6,0. A mistura é filtrada e o volume complementado para 40,0 mL com água destilada. A solução é conservada em frasco escuro a 4° C, contendo 1,0 mL de clorofórmio.

Solução Salina: NaCl (8,5 g); água destilada (1000 mL). H.

Solução Salina Tween: Tween 80 a 0,01% em solução salina. Usar 0,5 mL / 200 mL do meio.

Estoques das linhagens: conídios das linhagens usadas foram inoculados e cresceram em MC Agar semi-sólido (10 g/L), a 37°C e mantidos a 4°C.

Solução de 5-azacitidina: ($C_8H_{12}N_4O_5$ - peso molecular = 244,2 - Sigma Chemical Company n° A 2385) 50 mg de 5-azacitidina em 10 ml de tampão fosfato 1M pH = 7,4. Usar 7,3 μ l da solução em 50 ml de MC. Para os experimentos de desmetilação, 5-azacitidina é adicionada ao CM uma concentração final de 300 μ M (BULL e WOOTON, 1984).

5.1. 3. PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE CONÍDIOS

Conídios de UT448 e da linhagem UT184 são coletados das colônias crescidas em MC, lavando-se a superfície duas vezes com 10,0 mL de salina-tween 80 (0.1%) raspando-se suavemente com bastão de vidro. A suspensão é filtrada através de filtro de algodão, pré-lavada com salina. Todos estes passos são feitos sob condições de esterilidade. O filtrado é então centrifugado a 3.000 rpm. por 15 min., e lavado duas vezes com 15.0 mL de salina, transferido para frascos com rolhas e sonicados por 15 min. A suspensão de conídios tratados será mantida a 7°C durante todo o período de estudo (vários meses) enquanto os outros passos são executados.

5.2. ANÁLISES GENÉTICAS

5.2.1. OBTENÇÃO DO HETEROCÁRIO

10⁶ conídios das linhagens haplóides, com requerimentos nutricionais complementares, são colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de MM + 2,0% de MC líquido. Depois de 72 h a 37 °C, forma-se na superfície do líquido uma película densa que corresponde a uma massa micelial heterocariótica.

O heterocário dos cruzamentos é recolhido do tubo com alça de platina, e posicionado na superfície de uma placa com meio mínimo (MM) que é incubada, a 37 °C por 5 dias (Figura 2 A). Após esse período são observadas áreas de crescimento vigoroso e de cor verde dentro das regiões heterocarióticas. Estas áreas correspondem ao diplóide heterozigoto que consegue crescer bem em MM (Figura 2 B), uma vez que as auxotrofias envolvidas no cruzamento são complementares. Amostras destes conídios são transferidas novamente para MM para purificação do diplóide.

Figura 2. Produção de diplóides UT448//UT184 ou *Dp* (II-I)//UT184. (Cortesia de Dra. Nanci C. R. Dezotti, 2001)

5.2.2. OBTENÇÃO DOS DIPLÓIDES

Os diplóides *Dp* (II-I)//UT184 e UT448//UT184 foram obtidos por anastomose de hifas e fusão de núcleos geneticamente diferentes, fenômeno conhecido como heterocariose. Os 2% MC permitem uma pequena germinação dos conídios (*start*) levando a anastomose das hifas de linhagens de constituições genéticas diferentes, é seguida de fusão de alguns ($1/10^7$) dos núcleos haplóides gerando o diplóide. A principal característica de *A. nidulans* diplóide é sua cor verde-escuro em MM (Figura 2 B).

5.2.3. ANÁLISES MITÓTICAS

A análise mitótica, através do ciclo parassexual, visa fornecer informações sobre a segregação dos diferentes cromossomos durante a haploidização.

Ela também pode evidenciar alterações nas frequências de recombinação mitótica, bem como qualquer anormalidade na segregação dos diferentes grupos de ligação, durante a haploidização. Os diplóides UT448//UT184 e *Dp* (II-I)//UT184 foram haploidizados espontaneamente em placas contendo MC ou induzidas com MC + *pFA*, que foram incubadas a 37°C por 7 dias. Nesse período, o diplóide, que se encontra numa fase de vida instável, tende a estabilizar seu genoma sofrendo aneuploidias sucessivas ($2n-1$) até atingir o estado haplóide estável. Desse modo, os diversos setores haplóides que surgem a partir do diplóide são purificados em placas de MM. Cada setor purificado (geneticamente puro) é transferido para uma das 25 posições definidas da “placa mestra” (PM) contendo MC. Depois de três dias de incubação a 37°C, estas colônias são replicadas, com um replicador multifio, para placas de análise contendo meio seletivo (MS), suplementado de acordo com as auxotrofias das linhagens haplóides componentes do diplóide. As placas de análise (MS) são incubadas a 37°C e as leituras são feitas após 24 e 48 horas de incubação. A partir dos resultados das placas de análise, são obtidas as listas dos genótipos das colônias haplóides a partir das quais os dados dispostos nas tabelas de quadrado latino que permitem o cálculo das frequências de recombinação (FR), entre todos os marcadores envolvidos, a determinação das taxas de segregação alélicas, os cálculos das proporções das classes de paterais e recombinantes segregantes dos diplóides, de maneira rápida (vide Tabelas do Apêndice, de 1 a 14).

5. 2.4 ANÁLISES MEIÓTICAS

A Metodologia geral segue aquela descrita por Zucchi (1990a; b). A temperatura de incubação foi de 37 °C. Cruzamentos são feitos pela transferência dos conídios ou de microcolônias individuais, crescendo em MC sólido, para tubos contendo 2.5 mL de MM líquido mais 2% de CM, incubados por 3-5 dias a 37 °C. A massa micelial formada pelo heterocário é transferida para placas com MM, vedada e incubada por 18 dias a 37 °C. Os cleistotécios (corpos de frutificação) são limpos individualmente e esmagados em tubos com salina, diluídos e semeados em MC. Conídios da periferia de cada colônia ascospórica são transferidos para 25 posições definidas em placas de MC (padrão 5x5), incubadas por 48 h e as colônias são então replicadas nos seguintes meios seletivos: SM (MM mais 1.0 µg/ml riboflavina, 0.7 µg/ml ácido *p*-aminobenzóico, 0.02 µg/ml biotina, 0.5 µg/ml piridoxina), para placas de SM mais acriflavina (62 µg/ml) e para placas de SM desprovido, individualmente, de riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico, biotina, metionina e piridoxina. Inspeções visuais devem ser feitas depois de 24 e 48 horas; e para SM desprovido, individualmente, de riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico, biotina, piridoxina. Depois de 48 h de incubação os genótipos dos segregantes haplóides serão determinados e as frequências de crossing over meióticos, serão estimados.

A análise meiótica visa fornecer informações a respeito das distâncias genéticas entre os vários marcadores envolvidos num cruzamento, assim como a localização de novos *loci* mutantes nos diferentes grupos de ligação, além de determinar as suas relações com outros *loci* estudados.

5. 2.4.1. DESMETILAÇÃO DA LINHAGEM UT196 (MET A17)

O agente desmetilante 5-azacitidina será utilizado em uma placa contendo MC inoculada com a linhagem UT196, para verificar sua ação desmetiladora sobre o gene *meth* A17 e as conseqüências desta desmetilação sobre o comportamento desta linhagem tratada durante o processo da meiose.

Para isto as linhagens UT196, tratada e não tratada com 5-azacitidina, serão individualmente cruzadas com a linhagem testadora de crossing-over meiótico UT448. Os resultados deverão ser comparados com os resultados da análise meiótica da linhagem não tratada. O tratamento de UT196 com o agente desmetilante será feito em MC adicionado de 300 μ M de 5-azacitidina (5-azaC) (BULL e WOOTON, 1984). Conídios de UT196 serão inoculados em 9 pontos de placa de MC+5-azaC e incubada durante 5 dias a 37°C. Após esse período, conídios das colônias, tratadas e não tratadas, serão transferidos para 25 posições de placas contendo MC (padrão 5x5), incubadas a 37°C por 48 h e replicadas para placas de análises genotípicas, em busca de eventuais mudanças na expressão dos genes focalizados. As colônias que “reverteram” a expressão do gene mutante *met*, da linhagem UT196, para a condição “selvagem” *met*+(reativação), serão meioticamente cruzadas com a linhagem UT 448 *met*+

Colônias ascospóricas segregantes serão genotipicamente analisadas, de acordo com o método descrito no item anterior. A partir dos resultados obtidos das placas de análise, foi possível organizar (tipo quadrado latino) que permite verificar as relações de “linkage” ou não dos diversos marcadores genéticos focalizados neste cruzamento. A comparação dos resultados das análises meióticas de UT196, tratada e não tratada, com o agente desmetilante permitirá a determinação dos efeitos da metilação/desmetilação sobre a meiose, a expressão dos genes e a recombinação do DNA de *A. nidulans*.

5.3. EXPOSIÇÃO DE DIPLÓIDES *A. nidulans* AOS AGENTES GENOTÓXICOS/ANTIGENOTÓXICOS

As linhagens diplóides UT448//UT184 e *Dp* (II-I)//UT184 foram inoculadas em placas de Petri contendo MM, MM+So e MM+SoT e imediatamente submetidas ao vapor de benzeno. As placas contendo os conídios, sem as tampas foram invertidas sobre placas de mesmo diâmetro, contendo 20 mL de benzeno puro (MERCK) e também sem a tampa. Os tempos e exposição ao vapor de benzeno foram determinados como 0, 5, 10, 15 e 20 segundos. Estas exposições foram feitas sob condições de biossegurança e a 38 ° C. As placas foram tampadas e incubadas por 07 dias a 37 ° C. Este tratamento deu origem a setores diplóides provavelmente recombinantes que foram purificados em MM. Conídios destes diplóides foram transferidos para placas contendo MC + *pFA*. Após 06 dias a 37 ° C, os setores haplóides são transferidos para 25 posições definidas de placas de MC (padrão 5x5) e incubadas por 48 h. depois desta incubação foram replicadas para os seguintes meios de cultura: SM (MM + 1 µg/mL de riboflavina; 0,7 µg/mL de ácido *p*-aminobenzóico; 0,02 µg/mL de biotina; 0,5 µg/mL de piridoxina 1,0 µg/mL nicotinamida e 1,24 mg/mL de tiosulfato de sódio), SM desprovido individualmente de riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico, biotina, piridoxina, nicotinamida ou tiosulfato de sódio, para a determinação dos genótipos dos haplóides segregantes. As placas inoculadas, tratadas e os controles, foram incubadas a 37° C por cinco dias. As análises mitóticas convencionais (C2) foram executadas via ciclo parasexual envolvendo a haploidização dos diplóides originais em MC + *pFA*. Setores haplóides foram genotipicamente analisados como descritos no Diagrama 2. As placas expostas ao benzeno foram denominadas como MBen, MSoBen ou MSoTBen. O outro lote de placas corresponde aos experimentos controle sem tratamentos como MM, MSo ou MSoT.

5.3.1. AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

Sabe-se que agentes genotóxicos induzem lesões no DNA de diplóides heterozigotos para vários genes de requerimentos nutricionais que, se não reparadas imediatamente, podem aumentar as freqüências de crossing-over mitótico entre os genes auxotróficos heterozigotos (+/-) e o centrômero. Em animais, os efeitos destes eventos são detectados pelo aumento da freqüência de desenvolvimento de tumores. Pires e Zucchi (1994) desenvolveram um método para avaliar o potencial genotóxico de agentes ambientais (de alimentos, de fármacos e do meio ambiente, endógeno ou exógeno) baseado no aumento das freqüências de crossing-over mitótico. Este fenômeno mitótico promove a homozigotização de genes inicialmente em heterozigose. Segundo o Diagrama 3, após o crossing-over entre um gene de auxotrofia e o centrômero, quatro tipos de diplóides segregantes, deverão surgir em (+++, +/-, -/+ e -/-).

Quando o tratamento genotóxico é feito em MM, os diplóides recombinantes, homozigotos -/- não poderão se desenvolver. Isto se repetirá em cada ciclo mitótico, envolvendo pelo menos um dos genes heterozigotos, para auxotrofia ou para fontes de carbono. Os diplóides usados apresentam, pelo menos, 10 marcadores genéticos: *riboA1*, *pabaA124*, *biA1* (I), *piroA4* (IV), *sB3* (VI); *nicB8* (VII); *riboB2* (VIII), *galA1* (III); *facA303* (V); *lacA1* (VI). Deste modo, somente aqueles conídios dos setores diplóides segregantes ++, +/- e -/+, sobreviverão e formarão colônias em MM. Estas colônias $2n^R$ serão transferidas para MC e haploidizadas, espontaneamente ou para MC + *pFA* (*p*-fluorofenilalanina - 0,5 mL/200 mL). As razões entre as taxas (HI = %+/ %-) de segregantes haplóides, prototróficos (+) e segregantes haplóides auxotróficos (-) deverão ser determinadas. O valor

encontrado, para cada gene auxotrófico será o seu HI (Índice de Homozigotização). Como haverá uma exclusão sistemática das classes diplóides (-/-) de recombinantes, a razão entre as taxas de segregantes sempre será $>2,0$ quando ocorrer, pelo menos, um evento recombinacional entre um gene de auxotrofia e o centrômero. Isto resultará, no final, em dramáticas distorções nas taxas de segregações dos alelos mutantes e selvagens (-/+) esperadas, com HI sempre diferentes de 1,0. Valores em torno de 1,0 indicarão a não ocorrência do evento de recombinação, ou que o gene focalizado não está sendo selecionado contra, no MM. Este é o caso dos marcadores de cores de conídios *w* e/ou *cha*. Estes marcadores servirão como indicadores da eficiência do método.

Diagrama 2. Fluxograma de Trabalho. Análises Fenotípicas dos Segregantes Haplóides, FR, HI, e estatística

Diagrama 3. Determinação do HI. Crossing-Over Mitótico em Diplóides Eucarióticos e Seleção Contra os Diplóides Recombinantes Homozigotos para Genes Recessivos Auxotróficos

A Figura 3 apresenta as morfologias do diplóide UT448//UT184 em MC (A) e em MM (B) não tratados. Na placa com MC este diplóide mostrou instabilidade mitótica normal para linhagens diplóides de *A. nidulans*, em meios sem pressão seletiva. Esta instabilidade é muito maior quando um dos componentes haplóides é portador de segmentos de DNA em duplicata. Este é exatamente o caso deste diplóide *Dp* (II-I)//UT184. Já em MM, que exerce pressão seletiva contra recombinantes homozigotos recessivos, a ocorrência de lesões espontâneas no DNA são recombinagênicas e aumentam as frequências de setores diplóides recombinantes ($2n^R$) que são visualizados, com alguma dificuldade por serem também verdes.

Assim, quanto maior for o potencial genotóxico/recombinagênico do agente usado no tratamento dos diplóides, maiores serão os índices de homozigotização (HI). Desde que diplóides homozigotos (-/-) para marcadores auxotróficos não podem crescer em MM, a homozigotização de genes recessivos poderá se refletir na distorção da taxa de segregação dos alelos, mutantes e parentais, indicando quão genotóxico é o benzeno para o genoma de *A. nidulans*. O índice de homozigotização foi calculado a partir dos dados apresentados no formato de quadrados latinos, facilitados pelo Programa Placas (Elaborado pelo Dr. Cesar Bonatto – Deptº Física-UFPB).

Figura 3. Morfologia do diplóide *Dp* (II-I)/UT184 em MC (A) e em MM (B)

A razão entre os números (em porcentagem) de segregantes alélicos, prototróficos dos auxotróficos, de cada gene envolvido no cruzamento, dará o índice de homozigotização (HI) daquele gene e, indiretamente indicará as frequências de crossing-over mitótico, entre cada gene e o centrômero.

Quando não ocorre recombinação mitótica, os valores de HI (+/-) serão elevados. Eles indicarão que não houve lesões recombinagênicas no DNA, não houve aumento de crossing-over e nem houve haploidização. Assim, a maioria das colônias diplóides isoladas, após tratamentos com benzeno-soja, continua diplóide apesar de ter sido tratada com o agente haploidizante pFA, no MC.

5.3.2. AVALIAÇÃO DE ANTIGENOTOXICIDADE

A partir dos resultados indicando a consequência da genotoxicidade do benzeno, sobre o DNA de células eucarióticas e da determinação dos HI de cada gene, pode-se avaliar e compará-los com o potencial de antigenotoxicidade de fatores presentes (no nosso caso) na dieta. Neste trabalho usamos a soja como agente antigenotóxico modelo. Os resultados do tratamento com benzeno em MM serão comparados com os tratamentos com benzeno em meios contendo soja (MSo e MSoT). As diferenças estatísticas entre estes tratamentos, se significativas, fornecerão informações sobre o potencial antigenotóxico da soja (convencional ou transgênica).

5.4. ANÁLISES MOLECULARES

5.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA

Conídios (10^7) das linhagens diplóides controles e dos diplóides segregantes ($2n$), tratados ou não, são inoculados em 100 mL de meio completo líquido. Culturas para a obtenção de micélio suficiente para extração de DNA são incubadas a 37°C por 2 dias (SOUSA *et al.*, 2002). Sob rotação de 105 r.p.m, o micélio é coletado em funil com filtro, lavado, prensado, pesado e estocado a - 80 °C. A extração de DNA, segue metodologia recomendada na literatura para Ascomycetos CTAB (DOYLE e DOLE, 1987), extração com Tampão SDS DNeasy Plant Mini Kit (50) – Qiagen e Fenol/clorofórmio (RAEDER e BRODA, 1985). O DNA

total, segundo o protocolo, é ressuspenso em tampão TE. O DNA genômico será quantificado com o marcador "DNA High ladder mass Gibco" em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio.

5.4.2. CONDIÇÕES DA REAÇÃO PCR

As reações de amplificação são preparadas a partir de: *Master Mix para 1 reação (volume total para 13 μ L de reação): Tampão 10X PCR (1,3 μ L), $MgCl_2$ (0.76 mM), Primer (0,5 mM), dNTPs (0.19 mM), BSA (0,0025 mg), TaqPOL (1U) DNA (48 ng). As amplificações são realizadas em termociclador Perkin Elmer Applied Biosystems 9700, programado para um primeiro ciclo a 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação de 94 °C 1 minuto, anelamento do primer a 36 °C por 1 minuto e a extensão a 72 °C por 2 minutos, um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos, seguida por um "slot" de 4 °C por 24 horas. Os produtos de amplificação são separados por eletroforese em géis de 1% de agarose com brometo de etídio (0.5 μ g/mL) e visualizados em transluminador de luz ultravioleta, usando o sistema de fotodocumentação de géis Kodak Analysis System 120.

5.4.3. DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS PELA EXPOSIÇÃO DOS DIPLÓIDES AOS AGENTES GENOTÓXICOS ATRAVÉS DO RAPD

Estas análises foram feitas com DNA das 02 linhagens diplóides, originais, não tratadas (controles) UT448//UT184 e *Dp* (II-I)//UT184; e após os tratamentos genotóxicos e antígenotóxicos. Foram usados 7 primers. Os

oligonucleotídeos sintetizados pela GibcoBR cujas seqüências de bases encontram-se na Tabela 1.

A reprodutibilidade dos “fingerprints” será verificada através das comparações dos resultados de crescimento, extração de DNA e RAPD/PCR de cada linhagem, comparados repetidamente com cada primer, utilizando-se os diplóides UT448//UT184 e *Dp* (II-I) //UT184 não tratados.

São escolhidos 02 setores diplóides recombinantes em MM, depois de cada tratamento dos diplóides originais. Todos os primers selecionados apresentaram amplificação polimórfica em experimento similar de Sousa *et al.* (2002). Testes pilotos usando a linhagem não exposta foram conduzidos para verificar a reprodutibilidade dos perfis de RAPD, que foram confirmadas nas quatro tentativas realizadas. As seqüências oligonucleotídicas OPV10, OPK10, OPG10, OPM20, OPC20, OPJ20 e OPQ20 testadas foram capazes de gerar polimorfismos e foram capazes de detectar variabilidade entre os diplóides não expostos e suas versões expostas. Testes pilotos revelaram a presença de bandas comuns entre *Dp* II-I//UT184 e os diplóides recombinantes. Revelaram também que várias bandas foram detectadas apenas nos diplóides recombinantes (dados não apresentados).

5.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O programa Placas (Elaborado pelo Dr. CESAR BONATTO – Deptº Física-UFPB) gerou os quadrados latinos (Tabelas do Apêndice de número 1 a 14), nos quais são avaliados os índices de homozigotização. Cada linhagem apresenta um comportamento diferenciado à exposição ao benzeno. Durante a divisão celular, os diplóides recombinantes -/-, homozigotos recessivos são incapazes de crescer em MM, de forma que somente os +/+; +/- e -/+ serão capazes de se desenvolver.

As taxas de homozigotização fornecidas pelas linhagens, após a exposição aos agentes genotóxicos/antigenotóxicos, depois da haploidização das linhagens, resultam em distorções não esperadas de segregantes (4 selvagens para 2 prototróficos) para as duas linhagens empregadas. Os resultados das análises mitóticas dos diplóides e seus índices de homozigotização são dispostos no formato de Quadrado Latino. Os Índices de Homozigotização (HI) dos marcadores genéticos dos diplóides *Dp* (II-I) são bem superiores aos do diplóide controle. Isso decorre do fato de que *Dp* (II-I) é um mutante de recombinação/metilação. Este mutante tem apenas os mecanismos de reparo recombinacional em atividade e, assim, lesões induzidas pelos agentes genotóxicos e não reparados são altamente recombinagênicas. Estes fatos também foram observados por PIRES and ZUCCHI (1994), quando empregaram tais linhagens para estabelecimento do teste de detecção de genotoxicidade de outros agentes ambientais.

6.*RESULTADOS E DISCUSSÃO*

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. 1. ESTRATÉGIAS PARA ESTUDOS DOS FENÔMENOS EPIGENÉTICOS

De modo a tornar evidente a íntima relação existente entre os mecanismos fundamentais da genética de eucariotos superiores, tais como metilação, recombinação e carcinogênese, desenvolvemos estratégias especiais e, às vezes indiretas, para se atingir estes objetivos. Este trabalho, tipicamente multidisciplinar, envolveu várias técnicas de análises de genética (clássicas e moleculares) e de análises epigenéticas.

O sistema Biológico escolhido foi o fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. A linhagem escolhida foi um diplóide heterozigoto para 16 genes (alguns ligados outros não). Uma das linhagens componentes deste diplóide é a linhagem Master UT184, com marcadores genéticos em todos os oito grupos de ligação. A outra linhagem componente do diplóide é o mutante de recombinação *Dp* (II-I), obtida do tratamento da linhagem UT448 Master com o agente MNNG (nitrosoguanidina). Como o nome indica esta linhagem é portadora de segmento em duplicata transposto para o cromossomo I devidamente mapeado e bem caracterizado geneticamente.

Este mutante *Dp* (II-I) é um componente haplóide, do diplóide indicador de eventos recombinacionais conferindo-lhe as suas principais características para estudos de recombinação e/ou carcinogênese. Trata-se de uma linhagem mutante especial, sensível a luz ultravioleta, o que indica a sua deficiência de reparo de lesões induzidas no DNA. Os mecanismos de reparo do DNA dos quais esta linhagem haplóide é deficiente são o fotoreparo e o reparo por excisão. O único mecanismo no qual este mutante é proficiente é o reparo

recombinacional. Assim, qualquer lesão induzida no DNA só é restaurada por recombinação.

Zucchi *et. al.*, 2005 estabeleceram um método de se induzir lesões no DNA com doses submutagênicas do benzeno. Para se evitar qualquer contato do benzeno com as células e seus efeitos citotóxicos, foi usada exposição dos diplóides ao vapor de benzeno. Os autores estabeleceram também a dose sub-mutagênica ideal para se induzir lesões recombinagênicas no DNA. Os efeitos do tratamento dos diplóides com vapor de benzeno foram avaliados através da Genética Clássica e molecular. A técnica do RAPD fornecerá as informações de alterações sutis no DNA porém com efeitos dramáticos sobre a recombinação. De modo a se verificar se as alterações no DNA (dos diplóides tratados com benzeno), induzem a recombinação mitótica, os diplóides recombinantes foram isolados e analisados. Estas análises permitiram também determinação de qual é o tempo da exposição ao vapor de benzeno que é genotóxica, porém não mutagênica.

O sistema indicará se a soja, transgênica ou convencional, tem potencial antígenotóxico/anticarcinogênico suficiente para reverter o efeito causado pela indução com benzeno. Os resultados serão comparados para o dimensionamento os potenciais, carcinogênico do benzeno e anticarcinogênico da soja. Foram levadas em conta as características particulares de cada linhagem utilizada.

6.2. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS APÓS TRATAMENTOS GENOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO

Na Figura 4 este diplóide tratado com benzeno apresenta setores deteriorados conspícuos facilmente visualizados. A placa MBen (A) mostra estes setores $2n^R$ com frequência superior às observadas quando o tratamento com benzeno é feito em MSoBen ou em MSoTBen (Figura 5 A e 5 B).

Figura 4. Efeitos genotóxicos de vapor de benzeno (20 s) sobre a morfologia da colônia de *Dp* (II-I)/UT184 em MM (A). Amostras de conídios dos setores são transferidos para MC+pFA para haploidização (B).

Estes resultados (Figuras 4, 5) evidenciam o efeito genotóxico/recombinogênico do benzeno e dos efeitos antigenotóxico/antirecombinogênico, tanto da soja convencional como da soja transgênica. Mais adiante comentaremos cada um destes efeitos mais detalhadamente.

Os setores diplóides que surgem espontaneamente em MM (Figura 3 B) ou depois de induzido com benzeno (Figura 4 A) são transferidos para placas

contendo MC + *pFA* que, após incubação, apresentam vários setores haplóides, que serão genotipicamente analisados (Figura 5 B).

As Figuras 4 A e 5 B mostram como a soja, convencional ou transgênica, no meio de cultura, impede o aparecimento de setores diplóides recombinantes, mesmo depois da indução com benzeno. Mesmo assim, amostras de conídios das periferias das colônias tratadas com benzeno (5 A e 5 B), coletadas casualmente, são inoculados em MC + *pFA*. Os escassos setores haplóides, que surgem correspondem às linhagens parentais, componentes dos diplóides. Figuras 5 C e 5 D.

A Figura 6 apresenta morfologia dos dois diplóides, estudados neste trabalho, através de análises mitóticas convencionais. Na coluna da direita, a placa superior apresenta a linhagem UT448//UT184 inoculada em MC + *pFA* para haploidização. Entre os raros setores que aparecem alguns são haplóides e alguns apresentam morfologia deteriorada. Na placa à direita (meio), é uma placa mestra (PM) contém MC, para a qual foram transferidos estes setores haplóides (*n*). Nota-se o caráter deteriorado de alguns segregantes haplóides, com pouca conidiação e de cor escura. Este caráter é mais evidente quando se observam estas colônias pelo verso das placas. São estas colônias que são transferidas (com replicador multi-fio) para placas de meios seletivos (não mostradas) de composições variadas permitirão o conhecimento dos genótipos segregantes que, comparados com o genótipo do diplóide original, permitiram a determinação das frequências de recombinação mitótica (FR), conforme a Tabela 1 do apêndice e nos resultados obtidos laboratorialmente.

Figura 5. Efeitos antigenotóxicos da soja convencional (MSo) ou transgênica (MSoT) no diplóide de *Dp* (II-I)//UT184 de *A. nidulans* tratado com vapor de benzeno. Amostras de conídios das periferias das colônias diplóides são coletadas ao acaso e transferidas para MC + pFA porém a maioria permanece diplóide.

Figura 6. Etapas de análises mitóticas convencionais dos diplóides controles UT448//UT184 (à direita) e *Dp* II-I//UT184 (à esquerda) inoculados em MC + pFA. Após incubação cada setor haplóide (A) foi individualmente transferido para posições definidas de PM (B) (Placas Mestras de MC). Em ambos diplóides são vistas as colônias deterioradas (det), escuras e conidiação escassa. O diplóide *Dp* II-I//UT184 apresenta freqüência maior destas colônias det, melhor visualizadas pelo verso das colônias (C). Quando os diplóides são tratados com benzeno, as freqüências de haplóides det aumentam consideravelmente.

Nas placas da coluna à esquerda, estão os segregantes haplóides do diplóide *Dp* (II-I)//UT184. Os procedimentos são idênticos aos do diplóide descrito acima. Nota-se um aumento da frequência de segregantes deteriorados, no entanto, as grandes diferenças genótípicas encontram-se na Tabela 8 do apêndice, e nas análises moleculares (Figuras 8 e 9). As comparações estatísticas dos resultados das FR de cada diplóide, nos diferentes tratamentos, foram feitas e os resultados constam das Tabelas 6 e 7.

6.3. ANÁLISES GENÉTICAS

6.3.1. ANÁLISES MITÓTICAS

Seguindo as etapas que constam do fluxograma do trabalho (Diagrama 2), apresentamos os resultados obtidos, tanto dos tratamentos da linhagem controle (diplóide UT448//UT184) como da linhagem sensível a danos no DNA (linhagem *Dp* (II-I)//UT184). Os resultados completos destas análises constam das Tabelas do Apêndice de 1 a 14.

A Tabela 2 apresenta o resumo dos resultados de todas as análises mitóticas efetuadas neste trabalho. Foram 16 diplóides analisados, oito tratamentos diferentes, 3.322 colônias analisadas para 11 marcadores genéticos (média). Ou seja, 36.542 análises genótípicas. Os experimentos foram repetidos 3 vezes.

Os testes de avaliação de genotoxicidade do benzeno e da antigenotoxicidade da soja, nestes diplóides, foram executados simultaneamente e de acordo com o modelo descrito em material e métodos. Esta avaliação foi feita para cada diplóide isolado, antes e depois, de cada tratamento efetuado (Diagrama 2).

Abaixo apresentamos os principais resultados obtidos das análises mitóticas, contidas nas Tabelas dos Quadrados Latinos, do Apêndice de 1 a 14.

Tabela 1. Controle UT448//UT184 (C1), analisado de modo convencional. Foram 81 colônias analisadas. As taxas de segregação alélica (Média de 0,8) apresentaram-se normais e próximos de 1, como esperado para genes simples que apresentam padrão de segregação Mendeliana.

Também as FR e a distribuição das classes paternas e recombinantes estão dentro do esperado, com uma única exceção.

Tabela 2. Controle UT448//UT184 (C2) em MM apresentou setores diplóides recombinantes $2n^R$. Este é o resultado de um $2n^R$ haploidizado em MC + pFA. Foram 228 colônias e 10 genes analisados. As taxas médias de segregação alélica mostram que as distorções são favoráveis aos segregantes (+/+, -/+ e +/-). Estes diplóides apresentaram taxa de segregação (+/-) de 4,2. As FR também estão distorcidas, quando comparados com controle convencional (C1) (Tabela 1 do apêndice). Neste caso a distribuições das classes paternas estão normais.

Tabelas 3, 4, 5, 6. O diplóide UT448//UT184 foi cultivado em meio contendo soja. Conídios coletados de diferentes pontos da colônia foram transferidos para MC+pFA. Foram analisadas 100, 100, 100 e 124 segregantes haplóides, respectivamente, sendo 12 genes focalizados em cada diplóide analisado. As médias das taxas de segregação alélica foram de 62,9; 90,6; 99,0; 108,0 respectivamente. Isto indica que a maioria dos segregantes haplóides (+) foi prototróficas. Assim, a soja é capaz de impedir lesões recombinagênicas no DNA, reduzindo as FR e o número de segregantes haplóides auxotróficos (-). Os números de segregantes (+) esperados indicam que estes são na maioria diplóides que não haploidizaram. Os números de diplóides após tratamento com pFA, são próximos de 90% em todos diplóides analisados. O potencial da soja para prevenir lesões

espontâneas no DNA, quando cultivada em meio contendo soja, é evidente. Lesões espontâneas, ou foram prontamente reparadas ou não se instalaram no genoma da célula. A não segregação de colônias brancas (*w*-) é a prova disto. Em resumo, diplóides recombinantes de UT448//UT184 quando cultivados em meios contendo soja (MSo, MSoT, MSoTBen, e MSoBen), têm a haploidização inibida em MC + pFA. Como consequência disto, as taxas de segregação alélica são elevadas devido ao elevado número de segregantes (+) ou de diplóides não haploidizados. As taxas de diplóides são elevadas e próximas de 100%.

O tratamento com benzeno não muda a situação. Isto também é uma evidência do potencial protetor da soja. Estes resultados são bastante diferentes daqueles mostrados quando há tratamento com benzeno, em MM, na ausência de soja no meio de cultura.

Tabela 7. Controle (C2) do diplóide *Dp* (II-I)//UT184, em análise em MM. As pressões seletivas que atuam contra os haplóides portadores de mutação para auxotrofia são evidenciadas pelas altas distorções de segregação alélica. Estas distorções, cujo controle mostrou taxas de 1 (+) : 1 (-), variou muito, sendo que os marcadores de cor de conídios deram valores próximos a 1,0. Foram 250 colônias e 10 genes analisados (PIRES e ZUCCHI, 1994). A segregação alélica média foi de 22,8 e a % de segregantes diplóides que não haploidizaram foi de 20,0%.

Tabela 7a. O diplóide *Dp* (II-I)//UT184 foi tratado com 20 segundos de benzeno, em MM (MBen). Setores diplóides recombinantes foram transferidos para MC + pFA para haploidizarem. Foram analisadas 375 colônias (ZUCCHI *et al.*, 2005) e 10 genes. A média das taxas de segregação alélica foi de 4,8 e as taxas de diplóides que não haploidizaram foi de 59,2 %. Fica evidente que a distorção das taxas de segregação resultante do tratamento com benzeno, aumenta as FR.

Tabela 2. Lista das análises mitóticas realizadas, via ciclo parassexual. As respectivas tabelas encontram-se no apêndice

I).	Diplóide	Nr. Haplóides	Tratamentos	Nr. Tabela
Original diplóide	UT448//UT184	81	Conv. (C1)	Tab. 1
Setor 2n 1.2	UT448//UT184	228	MM (C2)	Tab. 2
Setor 2n 1.3	UT448//UT184	100	MSo	Tab. 3
Setor 2n 1.4	UT448//UT184	100	MSoBen20	Tab. 4
Setor 2n 1.5	UT448//UT184	100	MSoT	Tab. 5
Setor 2n 1.6	UT448//UT184	124	MSoTBen20	Tab. 6

II).	Diplóide	Nr. Haplóides	Tratamentos	Nr. Tabela
Original Diplóide	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	251	Conv. (C1)	Tab. 8
Setor 2n 2.1	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	307	MM (C2)	Tab. 7
Setor 2n 2.2	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	392	MBen 20 s	Tab. 7a
Setor 2n 2.3	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	121	MBen 5 s	Tab 9
Setor 2n 2.4	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	195	MBen 15 s	Tab 10
Setor 2n 2.5	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	125	MSo	Tab. 11
Setor 2n 2.6	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	125	MSoBen	Tab. 12
Setor 2n 2.7	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	125	MSoT	Tab. 13
Setor 2n 2.8	<i>Dp</i> (II-I)//UT184	100	MSoTBen20	Tab. 14

Abreviações: Conv. ou C1 (convencional) significa que conídios das linhagens dos diplóides originais, sem tratamento com benzeno foram transferidos para MC + *p*FA, para haploidização e posterior análise. MM (C2) significa conídios dos diplóides originais e dos setores recombinantes, crescidos em MM, sem tratamento com benzeno, foram transferidos para MC + *p*FA para haploidização e análise.

Tabela 8. O diplóide *Dp* (II-I)//UT184 (controle C1) foi inoculado apenas em MM depois de incubação a 37°C conídios foram transferidos para MC + *pFA* para haploidizar. Foram analisadas 251 colônias haplóides e 10 genes. A média das taxas de segregação alélica é de 7,9 e as taxas de setores diplóides não haploidizados foi de 20,7 %.

Tabelas 9 e 10. O diplóide *Dp* (II-I)//UT184 foi tratado com 5 e 15 s de vapor de benzeno, respectivamente. Os setores diplóides recombinantes que surgiram foram transferidos para MC + *pFA*. Foram analisados 121 e 195 colônias haplóides e 10 genes, respectivamente. Estas análises serviram para determinar o melhor tempo de exposição dos conídios diplóides aos vapores de benzeno. O critério desta determinação envolveu a dose que permitiu a obtenção do maior teor de lesões recombinagênicas, com a menor frequência de mutações. Nos experimentos que se seguiram usamos a exposição a 20 s de benzeno para as análises posteriores.

Tabela 11. O diplóide *Dp* (II-I)//UT184 (sem tratamento com benzeno) foi inoculado em MSo e depois de incubação a 37°C conídios foram transferidos para MC + *pFA* para haploidizar. Foram analisadas 125 colônias haplóides e 12 genes. A média das taxas de segregação alélica é de 94,2 e de diplóides que não haploidizaram é de 74,4%. Estes resultados indicaram que a soja no meio de cultura, impede a formação de lesões recombinogênicas no DNA e que a maioria das colônias analisadas está ainda na configuração diplóide.

Tabelas 12, 13 e 14. O diplóide *Dp* (II-I)//UT184 foi tratado com 20 s de benzeno em MSo, MSoBen e MSoTBen. Os setores diplóides recombinantes que surgiram, foram transferidos para MC + *pFA*. Foram analisados 125, 125, 100 colônias haplóides e 10 genes, respectivamente. As médias das taxas de

segregação alélica foram as mais elevadas e as taxas de setores diplóides, não haploidizados, foram igualmente altas. O desenvolvimento dos diplóides recombinantes em meios contendo soja resulta em aparente recuperação dos danos impostos pelo benzeno e, as altas % de diplóides não haploidizados, são as melhores evidências do efeito protetor da soja.

Tabelas 19, 20, 21. As análises meióticas de UT448 X UT196, controle e de cruzamentos de UT448 X UT196, quando a linhagem UT196 foi pré-tratada com agentes hipometilação, apresentaram resultados que evidenciam que a mutação *metA17* pode ser desmetilada e passar a expressar o caráter *met+*. Este fato evidencia que o estado de metilação do DNA influencia o resultado do crossing-over.

6. 4. COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DAS ANÁLISES MITÓTICAS

As comparações foram feitas entre os resultados das análises mitóticas convencionais e os resultados das análises dos diplóides, após indução de recombinação com benzeno e supressão com soja. Os dados, após estatísticas, forneceram informações sobre a eficiência de cada tratamento, bem como sobre o comportamento das diferentes linhagens diplóides usadas como sensores.

Na Tabela 3 (UT448//UT184) e na Tabela 4 (*Dp* II-I//UT184) estão apresentados os números de segregantes alélicos de cada gene focalizado. Estes números correspondem aos dados apresentados nos quadrados latinos do Apêndice, de forma resumida.

Estes resultados evidenciam a eficiência do sistema biológico que usamos para avaliar as conseqüências da indução de lesões recombinagênicas

(carcinogênicas) no DNA, com doses sub-mutagênicas do benzeno. Também confirmam o efeito protetor do DNA garantido pela soja (convencional como transgênica).

Tabela 3. Segregantes alélicos (+/-) do diplóide UT448//UT184 depois de vários tratamentos

Marcadores Genéticos	MC (C1) (81)	MM (C2) (228)	MBen (215)	MSo (100)	MSoBen (100)	MSoT (100)	MSoTBen (124)
<i>ribo +</i>	23	127	209	98	99	99	123
<i>ribo</i>	58	101	206	2	1	1	1
<i>paba +</i>	37	183	270	93	99	99	123
<i>paba</i>	44	45	145	7	1	1	1
<i>bio +</i>	36	173	250	98	99	99	123
<i>bio</i>	45	55	165	2	1	1	1
<i>w +</i>	33	147	255	99	99	99	123
<i>w</i>	48	81	160	1	1	1	1
<i>pyro +</i>	36	199	266	99	99	99	123
<i>pyro</i>	45	29	149	1	1	1	1
<i>gal +</i>	29	209	326	99	99	99	123
<i>gal</i>	52	19	89	1	1	1	1
<i>nic +</i>	37	181	256	99	97	1	27
<i>nic</i>	44	47	159	1	3	99	97
<i>fac +</i>	21	171		96	99	99	123
<i>fac</i>	60	57		4	1	1	1
<i>cha +</i>	23	78	183	97	93	99	120
<i>cha</i>	10	69	72	2	6	0	3
<i>lac +</i>		195	263	99	99	99	123
<i>Lac</i>		33	152	1	1	1	1

Nota: em parênteses, os números das colônias analisadas

Tabela 4. Segregantes alélicos (+/-) do diplóide *Dp* (II-I) //UT184 depois de vários tratamentos

Marcadores Genéticos	MC (C1) (251)	MM (C2) (250)	MBen (375)	MSo (125)	MSoBen (125)	MSoT (125)	MSoTBen (100)
<i>ribo</i> +	179	196	338	124	124	124	99
<i>ribo</i>	72	34	37	1	1	1	1
<i>paba</i> +	234	243	348	124	121	124	99
<i>paba</i>	17	7	27	1	4	1	1
<i>bi</i> +	231	247	303	122	123	124	99
<i>bi</i>	20	3	72	3	2	1	1
<i>w</i> +	151	162	349	94	101	124	99
<i>w</i>	100	88	26	31	24	1	1
<i>pyro</i> +	233	243	353	124	123	123	99
<i>pyro</i>	18	7	22	1	2	2	1
<i>lac</i> +	233	235	180	123	122	124	99
<i>lac</i>	18	15	15	2	3	1	1
<i>nic</i> +	213	232	342	124	124	117	99
<i>nic</i>	38	18	33	1	1	8	1
<i>fac</i> +	236	238	352	124	123	124	99
<i>fac</i>	15	12	23	1	2	1	1
<i>cha</i> +	83	59	278	93	100	119	98
<i>cha</i>	68	103	71	1	1	5	1
<i>gal</i> +	215		287	124	124	108	99
<i>gal</i>	36		88	1	1	17	1

Nota: em parênteses os números de colônias analisadas

Tabela 5. Média dos HI e % dos diplóides (não haploidizados em *pFA*) depois dos diferentes tratamentos

Linhagem UT448//UT184		
Tratamentos	Média dos HI	% de Diplóides
MC	0,84	0
MM	4,2	17,1
MBen	1,9	12
MSo	62,9	98
MSoBen	90,6	91
MSoT	99	91
MSoTBen	108,5	92,7
Linhagem <i>Dp</i> (II-I)//UT184		
Tratamentos	Média dos HI	% de Diplóides
MC	7,9	20,7
MM	22,8	20
MBen	4,8	59,2
MSo	94,2	74,4
MSoBen	73,6	77,4
MSoT	85	77,6
MSoTBen	99	90

Na Tabela 5 estão apresentados, também de modo resumido, as médias dos HI de todos genes focalizados e a % dos diplóides que não haploidizaram, em meio contendo soja, mesmo depois de tretados com o agente haploidizante *pFA*. Como pode ser verificado, quando o tratamento com benzeno é efetuado em meio contendo soja, a % de diplóides é maior do que quando não há soja no meio. As Figuras 7A e 7B ilustram os resultados da Tabela 5.

Nas Tabelas 6 e 7, verifica-se que as diferenças entre os HI dos vários marcadores apresentam 1% de significância, quando se comparam os dados da análise mitótica do diplóide controle com as análises mitóticas de todos os outros diplóides obtidos após os tratamentos: em MM, MBen, MSoBen, MSoT, MSoTBen.

Tabela 6 - Índice de Homozigotização (HI) de vários marcadores do diplóide UT448//UT184 antes de depois à exposição ao vapor de benzeno, em meios de cultura com e sem soja normal e transgênica.

Grupo de Ligação	I	I	I	II	IV	VI	III	VII	V	VIII
Marcadores Genéticos	<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>w</i>	<i>pyro</i>	<i>lac</i>	<i>gal</i>	<i>nic</i>	<i>fac</i>	<i>Cha</i>
Tratamento										
MC	0.40a	0.84a	0.80a	0.69a	0.80a		0.56a	0.84a	0.35a	2.30a
MM	1.26b	4.07b	3.14b	1.81b	6.86b	5.90a	11.00b	3.85b	3.00b	1.13a
MM+Benz	1.01b	1.86c	1.51c	1.59b	1.78c	1.73b	3.66c	1.61c		2.54b
MSo	49.00c	13.28d	49.00d	99.00c	99.00d	99.00c	99.00b	0.01d	24.00c	48.50c
MSo+Benz	99.00c	99.00d	99.00d	99.00c	99.00d	99.00c	99.00b	0.03d	99.00c	15.50c
MSoT	99.00c	99.00d	99.00d	99.00c	99.00d	99.00c	99.00b	0.01d	99.00c	99.00c
MSoT+Benz	123.00c	123.00d	123.00d	123.00c	123.00d	123.00c	123.00d	0.28e	123.00c	40.00c

Nota: mesma letra, χ^2 diferenças não significantes pela tabela de contingência 1% ($p<0.01$)

Tabela 7 - Índice de Homozigotização (HI) de vários marcadores do diplóide *Dp* (II-I)//UT184 antes de depois à exposição ao vapor de benzeno, em meios de cultura com e sem soja normal e transgênica.

Grupo de Ligação	I	I	I	II	IV	VI	III	VII	V	VIII
Marcadores Genéticos	<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>w</i>	<i>pyro</i>	<i>lac</i>	<i>gal</i>	<i>nic</i>	<i>fac</i>	<i>Cha</i>
Tratamento										
MC	2.48a	13.76a	7.70a	1.51a	12.94a	12.94a	5.97a	5.60a	15.73a	1.22a
MM	3.63a	34.71a	82.33b	1.84a	34.71ab	15.67a		12.89b	19.83a	0.57b
MM+Benz	9.13b	12.89a	4.20c	13.42b	16.04ab		3.26b	10.36ab	15.30a	3.91c
MSo	124.00c	124.00a	40.67ab	3.03c	124.00b	61.50a	124.00c	124.00c	124.00a	93.00d
MSo+Benz	124.00c	35.25a	61.50ab	4.21d	61.50ab	40.67a	124.00c	124.00c	61.50a	100.00c
MSoT	124.00c	124.00a	124.00b	124.00e	61.50ab	124.00b	6.35ab	14.65bc	124.00a	23.80c
MSoT+Benz	99.00c	99.00a	99.00a	99.00ce	99.00ab	99.00ab	99.00c	99.00bc	99.00a	98.00c

Nota: mesma letra, χ^2 diferenças não significantes pela tabela de contingência 1% ($p < 0.01$)

6. 5. ANÁLISES GENÉTICAS DOS CONTROLES

Conídios diplóides UT448//UT184 e *Dp* (II-I)//UT184 não tratados foram haploidizados em MC + *pFA*. Os segregantes haplóides foram analisados pelo método convencional (explicados adiante) e correspondem aos controles C1 e C2. A análise do controle 2 (ou C2) seguiu os mesmos procedimentos de C1, exceto que os conídios diplóides foram coletados de MM onde apenas os conídios diplóides (+//+, +/- e -//+) puderam desenvolver colônias. Desde que os marcadores genéticos são genes simples, as taxas de segregação alélicas obtidas apresentam valores próximos de 1,0, de acordo com a segregação Mendeliana típica. Taxas de segregação distorcidas ou diferentes de 1,0 para o gene *ribo* eram esperadas desde que nestas linhagens diplóides há duas mutações *ribo* (*riboA1*, GL I; and *ribo B2*, GL VIII). A linhagem diplóide *Dp* (II-I)//UT184 apresenta distorções nas taxas de segregação dos alelos. Exceto pelo reparo recombinacional, esta linhagem é deficiente em todos mecanismos conhecidos de reparo do DNA, de tal modo que

lesões não reparadas no DNA (induzidas ou espontâneas) resultam em frequências aumentadas de crossing-over mitótico.

Na linhagem diplóide UT448//UT184, não tratada com benzeno e crescida em MM e com seleção contra os diplóides *-/-*, são esperadas distorções nas taxas de segregação alélica. Isto, devido às lesões recombinagênicas espontâneas durante as replicações normais do DNA. A redução nos alelos mutantes (-) é esperada mesmo sem qualquer tratamento genotóxico, o diplóide *Dp* (II-I)//UT184 originalmente sensível apresentou distorções nas taxas de segregação alélica e isto é peculiar a esta linhagem diplóide (CASTRO-PRADO e ZUCCHI, 1996). Entretanto, as distorções são menores do que aquelas promovidas nesta linhagem (em MM) pelo benzeno, já que lesões não reparadas no DNA são recombinagênicas (ZUCCHI, 1990a; CASTRO-PRADO e ZUCCHI, 1996; PIRES e ZUCCHI, 1994; 1998). Assim, a análise comparativa destes comportamentos pode representar um sistema biológico adequado para se detectar recombinação mitótica induzida pelos agentes genotóxicos.

6. 5. 1. TRATAMENTO COM VAPOR DE BENZENO (GENOTÓXICO)

Os conídios do diplóide *Dp* (II-I)//UT184, após exposição a 20 s de benzeno, em MM, apresentou colônias com vários setores diplóides, após incubação (Figura 4 A). Estes setores foram individualmente transferidos para placas com MC + *pFA* para haploidização (Figura 4 B).

Como os conídios recombinantes diplóides (-/-) são contra selecionados em MM todos os outros setores diplóides devem apresentar conídios verdes e genótipos (+/+), (+/-), ou (-/+) para cada marcador genético. Distorções nas taxas de segregação alélica (isto é, diferentes de 1 + : 1 -) representam as anormalidades genótípicas apresentadas depois da haploidização dos diplóides. Distorções maiores do que as do controle C2 aparecem depois do tratamento com benzeno (Tabelas 3 e 4) . A Tabela 5 permite comparar as médias dos HI com a % de diplóides não haploidizados mesmo depois do tratamento com pFA. As Figuras 7 A e 7 B comparam as médias dos valores de HI com as % dos diplóides não haploidizados segregando dos diplóides tratados (A e B), mesmo depois do tratamento haploidizante com pFA.

Figura 7 A. Médias dos HI e % de diplóides não haploidizados derivados do diplóide UT448//UT184 após diferentes tratamentos

Figura 7 B. Médias dos HI e % de diplóides não haploidizados derivados do diplóide Dp II-I//UT184 após diferentes tratamentos

Figura 7 C. Efeitos de desmetilação, na meiose. Dados completos das análises meióticas estão nas Tabelas 19, 20 e 21 do apêndice

6. 5. 2. TRATAMENTO COM SOJA (ANTIGENOTÓXICO).

Os diplóides mantidos em meio contendo soja convencional ou transgênica, mostram taxas de segregação alélica muito altas e próximas de 100,0 (Tabelas 3 e 4). Morfologicamente as colônias dos diplóides são bastante normais e aparentemente não há variações distintas nas morfologias das colônias, tanto crescendo em MSo como em MSoT (Figuras 5 C e 5 D).

6. 5. 3. TRATAMENTO COM BENZENO (GENOTÓXICO) E COM SOJA (ANTIGENOTÓXICO).

Conídios dos diplóides UT448//UT184 e *Dp* (II-I)//UT184 tratados com benzeno em meio contendo soja (ambas, convencional e transgênica) não produziram setores diplóides segregantes distintos (Figura 5 A e 5 B).

A observação visual é confirmada pela análise mitótica: conídios da periferia das colônias tratadas com MSoBen ou MSoTBen transferidos para MC + *pFA* não são haploidizados normalmente e a maioria mantém a sua configuração diplóide (Figuras 5 C e 5 D). Neste contexto conclui-se que a hipótese sugerindo que a soja protege a célula do fungo contra os efeitos promovidos pelo agente recombinagênico usado (vapor de benzeno), tem sustentação. Uma outra possibilidade é que os fatores "stradiol like" da soja, presentes no meio de cultura, podem estimular um outro tipo de mecanismo de reparo do DNA. Esta possibilidade não foi descartada pela presente estratégia e ficou claro que ambas possibilidades incluem o efeito sinérgico do tipo de reparo do DNA e dos componentes nutricionais, exógenos. Comparando-se com os eucariotos superiores, isto pode significar que os componentes da dieta tanto podem estimular o reparo do DNA,

como podem aumentar a proteção celular contra agentes carcinogênicos ou recombinogênicos.

As semelhanças genéticas entre ambos diplóides originais sob diferentes tratamentos, foram observados. Uma resposta de HI semelhantes foi observada em ambos diplóides não tratados (MC e MM). Já o diplóide *Dp* (II-I) //UT184 é o mais sensível ao vapor de benzeno. Em meio contendo soja ambos diplóides se comportaram de modo muito semelhante, e seus HI foram os maiores que 50,0. Valores próximos de 100,0 indicam que a recombinação mitótica foi inibida e, depois do tratamento com *pFA*, a maioria dos segregantes diplóides não haploidizaram. Novamente, estes resultados apóiam a hipótese da proteção do DNA pelo tratamento com a soja. Parece claro que a soja presente no meio de cultura durante os tratamentos genotóxicos, tornam os diplóides refratários aos tratamentos recombinagênicos ajudando-os a manter seus estados diplóides.

Em particular e de acordo com os dados apresentados nas Tabela 5, e Figuras 7 A e 7 B, os valores de HI e as % dos diplóides não haploidizados, não apresentam diferenças significativas entre os tratamentos protetores com soja convencional ou com soja transgênica. Evidentemente, isso significa que a transgenia não afetou o potencial antigenotóxico, conhecido da soja convencional.

6. 6. ANÁLISES MEIÓTICAS DE LINHAGENS DESMETILADAS: EFEITOS DA METILAÇÃO SOBRE O CROSSING-OVER

Os resultados das análises meióticas do controle UT196 *met* X UT448 *met*⁺ estão na (Tabela 19) e das linhagens UT196 *met*⁺ X UT448 *met*⁺ (Tabela 20 e Tabela 21) do apêndice, depois dos tratamentos desmetilantes, como 5-azacitidina (5-azaC) e fator *mer* 30 (ZUCCHI *et al.*, subm.). Os efeitos da alteração

do estado de metilação do gene *met* A17 evidenciam que as frequências de recombinação meióticas no intervalo *wA2 – metA17* variam de 1,8%, 40% e 40% respectivamente (Figura 7C). O fator *mer30* é um produto de mutante de *A. nidulans*, com propriedades similares a desmetilase de DNA eucariótico (ZUCCHI, 1990 b; ZUCCHI *et al.*, subm.).

O incremento de recombinantes *w+met+*, entre os segregantes meióticos dos cruzamentos de UT196 desmetilada, com a linhagem UT448, é a forte evidência da reativação do gene *met-*. No entanto, as frequências de recombinação envolvendo os vários outros marcadores genéticos, ligados ou não ligados, dos outros grupos de ligação, mantêm valores similares aos do cruzamento controle, indicam que (neste caso) a desmetilação ocorreu de modo específico, afetando exclusivamente o gene *met-*. Desta forma, na linhagem UT196, o gene *met* A17 não se expressava porque estava pesadamente metilado comportando-se como um mutante *met*⁻, ou seja, deficiente de metionina. Após os tratamentos com desmetilantes, passou a expressar o caráter de linhagem metionina proficiente. Assim, quando se observam as taxas de segregantes alélicos *met+ / met*⁻ do cruzamento controle que é de 1,0 e nos dois outros cruzamentos de UT448 X UT196, envolvendo a linhagem UT196 desmetilada, estas taxas aumentam para 5,25 e 4,2, respectivamente, indicando um significativo aumento do número de segregantes alélicos *met+*, em relação ao número do alelo mutante *met*⁻. Isto obviamente se reflete nas frequências de recombinação *w-met* (com crossing-over): no cruzamento controle é de 1,8%, enquanto que e as frequências de recombinação meióticas no intervalo cromossômico *w-met*, nos dois outros cruzamentos de UT448

X UT196, envolvendo a linhagem UT196 desmetilada é de 40,0 % e 40,0 %, respectivamente. Este fato confirma, de modo insofismável a hipótese de que os mecanismos de metilação/desmetilação afetam tanto as freqüências de recombinação mitótica como meiótica, por alterarem a expressão dos genes, mimetizando a reversão da mutação *met* $\longrightarrow$ *met* +.

6. 7. ANÁLISES MOLECULARES

Para se confirmar, em bases moleculares, os resultados obtidos através dos métodos de genética clássica, todos diplóides expostos aos agentes genotóxico/antigenotóxico foram analisados também através do teste RAPD, aliado às análises de cluster. As seqüências testadas foram capazes de gerar polimorfismos e, todos os primers usados detectaram variabilidade entre os diplóides expostos. O uso de pequenos primers e seqüências randômicas, além de excluïrem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência envolvida, também forneceram uma estratégia muito importante para apoiar os dados previamente obtidos através da genética clássica. Esta estratégia tornou a investigação ampla do genoma, perfeitamente factível (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Os resultados da amplificação ao acaso do genoma dos diplóides originais do *Aspergillus nidulans* (em MC e MM) e dos respectivos diplóides, segregando depois dos tratamentos (MSo, MSoBen, MSoT, MSoTBen), foram comparados entre si e com os resultados dos diplóides não expostos (Figuras 9 A a F).

6. 7. 1. LINHAGENS PARENTAIS (CONTROLES)

Depois dos testes de RAPD, os diplóides controles e seus componentes haplóides, foram comparados pela análise de Cluster. Tais resultados estão apresentados nas Figuras 8 A e 8 B.

Tipificação genética das linhagens do *A. nidulans* (*Dp* II-I//UT184, e UT448//UT184; *Dp* II-I//UT184; UT448; UT184) foram analisados através dos “finger prints” - RAPD gerados por um lote dos 07 primers randômicos. Uma tipificação dos controles, foi feita pelos processos de eletroforeses e das análises dos clusters. Foram incluídas duas amostras de duas linhagens não relacionadas, isoladas de *Aspergillus flavus* (F5 e F30).

As amostras foram analisadas usando-se dois métodos de avaliação de similaridades: através dos coeficientes de “Jaccard and Simple Matching Coefficient”, usando UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average”) como um sistema de agrupamento.

O critério de formação de grupo se refere às distâncias médias entre todos pares de características de cada grupo. Valores próximos de 1,0 indicam alta similaridade entre as amostras (Figuras 8 A e 8 B).

Em ambos tipos de coeficientes usados, *A. nidulans* mostrou-se localizado de modo distinto do *A. flavus*. Isto indicou que a separação intraespecífica foi detectada eficientemente pelo método e indica a precisão da análise dos dados obtidos. Amostras das linhagens UT448 e do mutante *Dp* (II-I) mostraram idêntica similaridade genética (=1), e indicaram que nem o teste RAPD, nem o lote dos 07 primers, foram suficientes para evidenciar qualquer marcador genético que

permitisse suas distinções. Na verdade, isto era esperado desde que *Dp* (II-I) é um mutante derivado da linhagem UT448 strain (Figuras 8 A e 8 B).

“Simple Matching Coefficients” mostraram três grupos de similaridade: a) F5 e F30, b) *Dp* (II-I)//UT184 e UT448//UT184 e, c) UT448, *Dp* (II-I) e UT184. O último grupo (c) apresentou coeficiente de similaridade 1,0, entre UT448 e *Dp* (II-I) (ou Z1, antiga denominação deste mutante, (ZUCCHI, 1990a) evidenciando suas similaridades genéticas nas condições analíticas atuais. UT184 apresentou o coeficiente de 0,82. Entre os componentes do grupo do *Aspergillus nidulans*, esta linhagem apresentou as maiores diferenças em relação às outras linhagens do mesmo grupo. No grupo dos diplóides (b) o coeficiente de similaridade foi de 0,94, ou próximo a 1,0. F5 e F30 apresentaram coeficientes de similaridade de 0,76.

Os coeficientes de similaridades Jaccard das linhagens haplóides UT448 e *Dp* II-I são muito próximos de 1,0 evidenciando sua similaridade genética, sob as presentes condições de análises. Os diplóides apresentaram coeficientes estimados de 0,92 e, para a linhagem UT184 foi de 0,75. O grupo de *Aspergillus flavus* apresentou um coeficiente de 0,5. Ambos coeficientes usados mostraram resultados semelhantes. Os primers usados confirmaram que as linhagens UT448 e *Dp* (II-I) são geneticamente semelhantes. Os diplóides são geneticamente muito próximos e a linhagem UT184 foi a que apresentou as maiores diferenças relativas a todos os outros do grupo do *A. nidulans*.

O método confirmou a distinção entre as espécies, e os clusters correspondem aos resultados descobertos através das análises da genética básica e aplicada. A principal vantagem da estimativa das distâncias genéticas entre as amostras testadas pelo PCR seguido de RAPD reside na amplificação de ambas

regiões dos genomas, isto é, tanto daquelas transcritas e/ou traduzidas como daquelas não-codantes.

Desde que a análise empregada pode detectar mesmo alterações sutis no genoma do *Aspergillus*, sua sensibilidade mostrou-se bem adequada para descobrir alterações submutagênicas envolvidas e promovidas pelos agentes genotóxicos e antigenotóxicos. Assim, seu uso é conveniente para avaliações que combinam ambos tipos de análises: genética e molecular.

Figura 8 A. Eletroforese da tipificação das linhagens de *A. nidulans* (*Dp* II-I//UT184, UT448//UT184; *Dp* II-I; UT448; UT184). As análises eletroforéticas e dos clusters incluíram duas amostras de linhagens não relacionadas de *Aspergillus flavus* (F5 e F30). **Figura 8 B.** As amostras foram analisadas usando-se dois métodos de similaridade: Jaccard's and Simple Matching Coefficients, using UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) como um sistema de agrupamento. Critério de agrupamento se refere a media da distância entre todos pares de características de cada grupo. Valores próximos de 1,0 indicam alta similaridade entre amostras. OBS. Z1 é a antiga designação do mutante *Dp* (II-I).

6. 7. 2. DIPLÓIDES TRATADOS

Dados obtidos por RAPD, relacionados aos sete diferentes primers, mostraram que o diplóide UT448//UT184, obtido em MM após tratamento com benzeno (MBen) apresentaram diferentes perfis.

Semelhantes análises prévias, usando-se agentes genotóxicos, tais como vapor de benzeno (ZUCCHI *et al.*, 2005) ou de mercúrio (SOUSA, 2002) mostraram variações nos perfis RAPD na linhagem usada do *A. nidulans*. Isto indicou os efeitos diretos das substâncias testadas, sobre o DNA genômico deste fungo. Estes resultados, associados aos aumentos das frequências de recombinação mitótica, como indicado pelos Índices de Homozigotização (HI) mostraram, uma vez mais, a sensibilidade das linhagens diplóides especiais do *A. nidulans*, para revelar as alterações no DNA induzidas pelos agentes genotóxicos exógenos.

Usando-se ambos tipos de análises de clusters (Jaccard's e Simple Matching Coefficients), mostramos que dois grupos de discriminação separaram o diplóide UT448//UT184 em MM, do diplóide UT448//UT184 em MBen. Na realidade, um cluster das linhagens está agrupado próximo ao UT448//UT184 em MBen, MSo e MSoBen, enquanto que o outro está próximo do UT448//UT184 em MM, MSoT e MSoTBen. Desta forma, há uma nítida separação entre a linhagem diplóide UT448//UT184 e seus derivados diplóides: um grupo inclui aquelas linhagens tratadas em MSo, e os outros incluem aqueles tratados em MSoT. A única exceção é MSo1 e não temos nenhuma explicação científica disponível para o presente caso (Figura 9 C a F), cujos resultados brutos estão nas Tabelas 15 a 18 do Apêndice.

Usando-se as análises de cluster como descritas acima, novamente observam-se os grupos de discriminação que separam os diplóides *Dp* (II-I)//UT184 em MM do *Dp* (II-I)//UT184, em MBen. Em um grupo estão as linhagens mais próximas de *Dp* (II-I)//UT184 em MM, MSo and MSoBen. No outro grupo estão as linhagens mais próximas do *Dp* (II-I)//UT184 em MM, MSoT and MSoTBen. Novamente, há uma nítida separação entre linhagens diplóides *Dp* (II-I)//UT184 e diplóides derivados recombinantes: um grupo inclui aquelas linhagens tratadas em MSo, enquanto que o outro grupo inclui aquelas linhagens tratadas em MSoT. Não há exceções registradas.

Finalmente, ambos tipos de soja (tradicional e transgênica) adicionadas ao meio de cultura foram capazes de proteger o DNA de lesões induzidas pelo benzeno. Entretanto, a soja transgênica evidenciou maior potencial antígeno-tóxico do que a soja convencional. Embora ambos diplóides heterozigotos usados como indicadores biológicos foram eficientes para detectar os efeitos dos vapores de benzeno, em doses submutagênicas, a linhagem mais sensível foi a *Dp* (II-I)//UT448, tanto nas estratégias de genética clássica como de molecular. Soja transgênica, em meio de cultura restaura alterações genômicas induzidas até atingir a configuração genômica do diplóide original. A proteção envolvida reflete-se em um tipo muito eficiente de inibição da frequência de crossing-over mitótico induzido.

Como crossing-over mitótico, em diplóides eucarióticos sinalizam para o desenvolvimento da carcinogênese, isto significaria que a soja na dieta pode inibir tais efeitos danosos, muito eficientemente.

Excetuando-se alterações recombinagênicas no DNA, as doses submutagênicas do benzeno usadas não mostraram nenhum efeito mutagênico no genoma do *A. nidulans*. Na realidade, as alterações detectadas mostraram-se

reversíveis pelos conhecidos efeitos antigenotóxicos de fatores componentes da dieta (dados não apresentados).

A genética básica detectou alterações na expressão, regulação e reparo de genes que foram também evidenciadas molecularmente. Ambas estratégias confirmaram que as alterações no DNA (recombinogênicas/carcinogênicas) poderiam ser exclusivamente devido aos mecanismos de metilação do DNA, ativando ou inativando a expressão dos genes. Isto também ficou claro depois da verificação da perfeita conexão existente, entre os resultados da presente estratégia. As análises estatísticas corroboraram o pressuposto da hipótese de trabalho, formulada neste trabalho.

Figura 9 A. UT448//UT184 **Figura 9 B. *Dp II-I*//UT184**

Figura 9. Perfis de amplificação por RAPD para os primers V10, C20, G10, J20, M20, Q20 e K10. A: 1) KbPlus; 2).UT448//UT184 MC; 3) UT448//UT184 MM; 4) UT448//UT184 MBen; 5) MSo; 6) MSo; 7) MSoBen; 8) MsoBen; 9) MSoT; 10) MSoT; 11) MSoTben; 12) MSoTben **B:** 1) 1KbPlus; 2) *DpII-I*//UT184 MC; 3) *DpII-I*//UT184 MM; 4) *DpII-I*//UT184 MBen; 5) MSo; 6) MSo; 7) MSoBen; 8) MSoBen; 9) MSoT; 10) MSoT; 11) MSoTBen; 12) MSoTBen.

Figura 9 C. Grupamentos de similaridade de discriminação dos diplóides UT448//UT184 com e sem tratamentos (método Jaccard's coefficient)

Figura 9 D. Grupamentos de similaridade de discriminação dos diplóides UT448//UT184 com e sem tratamentos (método Simple matching coefficient)

Figura 9 E. Grupamentos de similaridade de discriminação dos diplóides Dp II-I//UT184 com e sem tratamentos (método Jaccard's coefficient)

Figura 9 F. Grupamentos de similaridade de discriminação dos diplóides UT448//UT184 com e sem tratamentos (método Simple matching coefficient)

7.CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os resultados inéditos apresentados confirmam todos os itens dos nossos objetivos, ou seja: as linhagens escolhidas como indicadoras de efeitos genotóxicos/recombinagênicos e, de modo indireto, do teor carcinogênico de baixas doses de benzeno, mostraram-se muito sensíveis e adequadas aos propósitos. Foi confirmada a conhecida propriedade anticarcinogênica/antigenotóxica e antirecombinagênica da soja convencional. A soja resistente ao herbicida glifosato (transgênica) mostrou que estas propriedades, comprovadas para a soja convencional, não foram alteradas pela transgenia (25%) dos grãos usados nos meios MSoT ou MSoTBen.

Enfim, este é um teste rápido, sensível e pouco dispendioso para detecção de genotoxicidade ambiental. A sua aplicação para uma enorme lista de produtos transgênicos e derivados, fármacos ou novos produtos de Biotecnologia já foram iniciados. A Tabela 9 compara o teste proposto com vários outros testes afins.

Os eventos genéticos envolvendo recombinação mitótica de eucariotos têm importantes funções biológicas. Entretanto, os potenciais dos fatores recombinagênicos (putativamente carcinogênicos) especialmente em baixas doses, aguardam para serem descobertos ou definidos (ZUCCHI, 1996). Métodos apresentados aqui usam linhagens de *A. nidulans* como um sistema modelo, que aparentemente indica, através de estratégias adequadas, o preenchimento do vazio mencionado, pois:

a) permite a detecção rápida e precisa dos efeitos genéticos de substâncias potencialmente deletérias como o benzeno, mesmo em doses submutagênicas;

b) permite antever o potencial das propriedades antigenotóxicas de agentes da dieta, contribuindo para a manipulação adequada de tais materiais;

c) permite também testar os produtos podendo contribuir para evitar efeitos nocivos infringidos por poluentes ambientais, ao DNA.

Os principais resultados obtidos foram: a) Os efeitos dos vapores de benzeno em conídios expostos por 20 s representam o limite da indução de alterações não mutagênicas, no DNA, e a promoção de efeitos tipicamente epigenéticos. Estas alterações foram herdadas através das divisões celulares e mostraram-se relativamente estáveis, 20% de sobreviventes não mostraram a ocorrência de nenhuma mutação verdadeira entre os genes focalizados. As alterações foram revertidas pelos agentes hipometilantes ambientais. 5 s de exposição, aos vapores de benzeno, foi o mínimo de exposição detectado pelo teste do HI (Zucchi *et al.*, 2005); b) o teste do HI é rápido pois leva cerca de 15-20 dias para produzir os resultados pretendidos. c) alterações visualmente detectadas na morfologia das colônias depois de 20 s de exposição de conídios diplóides, aos vapores de benzeno em MM, é seguida da recuperação de sua morfologia normal, depois de tratada com soja, são detectados visualmente (Figuras 4 A e B; 5 A e B). Tais resultados foram apoiados pelas análises de genética básica e molecular (Tabelas 3 e 4; Figuras 9 A a F; Tabelas 15 a 18 do Apêndice); d) a sensibilidade do teste é maior à medida que se aumenta o número de marcadores genéticos para requerimentos nutricionais heterozigotos nas linhagens indicadoras. No entanto apenas um ou dois marcadores são suficientes para apresentar resultados esperados. e) Soja convencional ou transgênica, adicionada ao meio de cultura mostraram nítida proteção contra lesões recombinogênicas no DNA (induzidas ou espontâneas). f) Soja transgênica (25%) mostrou ser mais eficiente do que a soja

convencional, para restaurar alterações epigenéticas no DNA, espontâneas ou induzidas pelo benzeno.

As análises meióticas de linhagem *met*⁻, tratada com agentes desmetilantes, mostraram que a reativação da expressão do gene afeta o resultado do crossing-over meiótico. Isto sugere que os resultados do crossing-over meiótico como do crossing-over mitótico, são dependentes do estado de metilação dos genes envolvidos no mecanismo de recombinação.

Sob as condições testadas, pode-se sugerir que danos causados por fatores ambientais no genoma eucariótico de *A. nidulans* podem ser evitados ou reduzidos pelos fatores da dieta. Principalmente para a linhagem diplóide *Dp II-III/UT184* os desvios encontrados nos valores do HI das linhagens do *A. nidulans* expostas, não expostas e protegidas com soja, mostraram que vapores de benzeno apresentam permeabilidade celular e podem afetar componentes nucleares diretamente. Alterações infringidas no DNA foram detectadas tanto por genética clássica como por estratégias moleculares. Na verdade, neste ultimo, a técnica do RAPD evidenciou nitidamente a variação nos perfis do DNA amplificado. Os efeitos antigenotóxicos da soja protegeram as linhagens diplóides de *Aspergillus nidulans* crescendo em diferentes meios. Suas culturas mostraram recombinação mitótica reduzida (como avaliadas pelo teste do HI), além da redução da variação do DNA (como avaliado pela técnica do RAPD), mesmo depois da indução de genotoxicidade pelo vapor do benzeno.

O sistema biológico para detectar ambos efeitos, genotóxico e antigenotóxico, foi muito eficiente, rápido e muito barato. Além disso, quanto às aplicações práticas tal sistema é certamente também capaz de detectar potenciais carcinogênicos/anticarcinogênicos de vários fatores ambientais. Desde que os

aspectos envolvidos na regulação gênica estão sob atenção especial, os métodos apresentados podem adicionar estratégias eficientes para se testar, mesmo aqueles aspectos genéticos menos conhecidos, como silenciamento gênicos, e proteção genômica. Além disso, a presente estratégia estabelece um modelo consistente para se testar também eventos epigenéticos. Convém reforçar que o modelo mencionado e os métodos podem ser adaptados para se testar efeitos nocivos de muitos outros fatores ambientais cujos potenciais antigenotóxicos são suspeitos, ou implicados. Os efeitos antigenotóxicos da soja (convencional e transgênica) que foram avaliados através de métodos de genética básica e molecular e provaram estar correto.

Depois de se introduzir a soja nos meios de cultura, as análises genéticas (Figuras 4 e 5; Tabelas 6, 7 e 8), o RAPD e as análises dos clusters relacionados mostraram baixa variação (Figuras 9 A e 9 B). Tais resultados apóiam aqueles encontrados depois da determinação dos HI. A sugestão implícita é que a soja fornece um fator que tanto pode estimular reparo rápido dos danos induzidos no DNA, como pode participar da proteção genômica. Este é o primeiro exemplo pelo qual um método consistente é oferecido para analisar os fenômenos epigenéticos.

Finalmente, este é o único teste de detecção de crossing-over mitótico eucariótico existente até o momento, rápido e barato que não utiliza animais e que determina carcinogenicidade. O quadro da Tabela 9 resume nossos achados.

Tabela 9. Comparações e contrastes entre o teste do HI com outros testes de genotoxicidade conhecidos

TESTE TIPO	Alvo do teste	Tipos de amostra	Usa animais?	Execução fácil e rápida?	Determina carcinogenicidade?
COMETA	DANO E REPARO DO DNA	CÉLULAS	SIM	SIM	NÃO
AMES	MUTAGENICIDADE NO GENE <i>his</i> ⁻	<i>Salmonella typhimurium</i> (<i>his</i> ⁻)	NÃO	SIM	NÃO
MUTATOX	AGENTE GENOTÓXICO	<i>Vibre fischei</i>	SIM	SIM	NÃO
MUTA-MOUSE	MUTAGENICIDADE NO GENE <i>lac</i>	MUTA MOUSE	SIM	NÃO	NÃO
FOCOS EM FÍGADO DE RATO	FOCOS HEPÁTICOS ALTERADOS	FÍGADO DE RATO	SIM	NÃO	SIM
HI	FREQUÊNCIAS DE RECOMBINAÇÃO MITÓTICA ALTERADAS	DIPLÓIDE HETEROZIGÓTODE ASPERGILLUS NIDULANS	NÃO	SIM	SIM

(LAM and LEUNG, 2003; modificado por ZUCCHI, 2005)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

SITES RECOMENDADOS

1. Genotoxicity assays. Disponível em:

[http://www.bch.cuhk.edu.hk/webct/ens4310/kmc/Genotoxicity Assays](http://www.bch.cuhk.edu.hk/webct/ens4310/kmc/Genotoxicity_Assays)

2. Metilação do DNA. Disponível em:

<http://deainfo.nci.nih.gov/concepts/DNAmethylation.html/>

3. *Aspergillus nidulans*. Disponível em:

- http://labmed.ucsf.edu/Education/fung_morph/asperpage.html
- <http://www.aspergillus.man.ac.uk>

5. Testes de genotoxicidade. LAM, T. and Leung, D. 2003. Available from:

<http://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/rfa-ca-03-016.html>

6. National Library of Medicine. List of Journals indexed in Index Medicus, 2001.

Available from: www.ncbi.nlm.gov/entrez/browser.cgi

www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html

6. Programa PLACAS, versão 01/06/2000. Copyright cbonato. Desenvolvido com Delphi 4. [cbonato@zaz.com.br/](mailto:cbonato@zaz.com.br)

AKSOY, M. Hematotoxicity and carcinogenicity of benzene. **Environm. Health Perspect.**, 82:193-197, 1989.

AMIR, R.E.; VAN DEN VEYVER, I.B.; WAN, M.; TRAN, C.Q.; FRANCKE, U.; ZOGHBI, H.Y. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. **Nat Genet.**, 23:185-188, 1999.

BARONIAN, K.H.R. The use of yeast moulds as sensing elements in biosensors. **Bios. Bioelectr.**, 19: 953-962, 2004.

BECHOR, O.; SMULSKI, D.R.; VAN DYK, T.K.; LAROSSA, R.A.; BELKIN, S. Recombinant microorganisms as environmental biosensors: pollutants detection by *Escherichia coli* bearing *fabA':lux* fusions. **J. Biotechnology**. 94: 125 132, 2002.

BESTOR, T. H. The host-defense functions of genomic methylation patterns. **Novartis Found. Symp.**, 214: 187-195, 1998.

BESTOR, T. H.; COXON, A. The pros and cons of cytosine methylation. **Curr. Bio.**, 3: 384-386. 1993

BESTOR, T.H. Gene silencing: methylation meets acetylation. **Nature.**, 393: 311-312, 1999.

BESTOR, T.H.; TYCKO, B. Creation of genomic methylation. **Nat. Genet.**, 12: 363-367, 1996.

BIRD, A.P. CpG – rich islands and the function of DNA methylation. **Nature.**, 321: 209-213, 1986.

BROWN, R., STRATHDEE, G. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. **Trends Mol. Med.**, 8: S43-S48, 2002.

BULL, J.H.; WOOTON, J.C. Heavily methylated amplified DNA in transformants of *Neurospora crassa*. **Nature**, 310: 701-704, 1984.

CAI, J.; MAO, Z.; HWANG J-J.; LU, S. C. Differential expression of methionine adenosyltransferase genes influences the rate of growth of human hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Res.**, 58:144-1450, 1998.

CASTRO PRADO, M.A.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. A gene inactivation system acting in meiosis of a duplicated strain of *A. nidulans*. **Brazil. J. Genet.**, 19: 17-25, 1996.

CASTRO-PRADO, M.A.A.; GEBARA, J.S.; QUEROL, C. B.; ZUCCHI, O.L.A.D.; ZUCCHI, T.M. A.D. Duplicate gene inactivation affects ascospore viability in *Aspergillus nidulans*. **Braz. J. Genet.**, 19: 381-386, 1996.

CASTRO-PRADO, M.A.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. Stabilization of a duplicated segment (*Dp* II-I) in an *uvr* mutant of *Aspergillus nidulans* through genetic mechanisms. **Brazil. J. Genet.**, 14: 239-248, 1991a.

CHRISTMAN, J.K.; SHEIKHNEJAD, G.; DIZIK, M.; ABILEAH, S.; WAINFAN, E. Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. **Carcinogenesis**, 14: 551-557, 1993.

CLUTTERBUCK, A.J. *Aspergillus nidulans* genetic loci (n = 8). In: O'Brien, S.J. (Ed.), Genetic maps. New York: **Cold Spring Harbor**, pp. 71-84, 1993.

COLOT, V.; MALOISIEL, L. E.; ROSSIGNOL, J-L. Interchromosomal transfer of epigenetic states in *Ascomobolus*: transfer of DNA methylation is mechanistically related to homologous recombination. **Cell.**, 86: 854-864, 1996.

COLOT, V; ROSSIGNOL, J.L. DNA repeats and homologous recombination: a probable role for DNA methylation in genome stability of eukaryotic cells. **J Soc Biol.**, 193: 29-34, 1999.

CREBELLI, R. Threshold- mediated mechanisms in mutagenesis: implication in the classification and regulation of chemical mutagens. **Mutat. Res.**, 464: 129-135, 2001.

CREEK, M.R.; MANI, C.; VOGEL, J.S.; TURTELTAUB, K.W. Tissue distribution and macromolecular binding of extremely low doses of (14c)-benzene in B6C3F1 mice. **Carcinogenesis**, 18: 2421-2427, 1997.

DAVIS, T. L.; TREMBLAY, K. D.; BARTOLOMEI, M. S. Imprinted expression and methylation of the mouse H19 gene are conserved in extraembryonic lineages. **Dev. Genet.**, 23: 111-118, 1998.

- DAWKINS, R. O Capelão do Diabo: ensaios escolhidos. Ed. **Schwarcz Ltda.**, p. 37, 2005.
- DEZOTTI, N.O.C.R.; ZUCCHI, T.M.A.D. Identification of *Aspergillus nidulans* genes essential for accumulation of sterigmatocystin. **Fungal Genet. Biol.**, 34: 93-105, 2001.
- DOYLE, J. J.; DOLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 12: 13-15, 1987.
- EHRlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene**, 21: 5400-5413, 2002.
- FENECH, M., RINALDI, J. A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. **Carcinogenesis**, 16: 223-230.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA, Brasil**, 1998.
- FORBES, E. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage group in *A. nidulans*. **Heredity**, 13: 67-80, 1959.
- FUKATA, H.; MORI, C.. Epigenetic alterations by the chemical substances, food and environmental factors. **Reprod. Med. Biol.**, 3: 115-121, 2004.
- FURUMAI, R.; MATSUYAMA, A.; KOBASHI, N.; LEE, K-H.; NISHIYAMA, M.; NAKAJIMA, H.; TANAKA, A.; KOMATSU, Y.; NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; HORINOUCI, S. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. **Cancer Res.**, 62: 4916-4921. 2002.
- HENAN, R. S.; STEINBERG, S. E. The effects of alcohol on folate metabolism. **Annu. Rev. Med.**, 3: 345-354, 1982.
- HANSEN R.S.; WIJMEGA, C.; LUO, P.; STANEK, A.M.; CANFIELD, T.K.; WEEMAES, C.M.; GARTLER, S.M. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 96: 14412-14417, 1999.

HILLMAN, R.S.; STEINBERG, S. E. The effects of alcohol on folate metabolisms. **Annu. Rev. Med.**, 3: 345-354, 1982.

HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetic defects. **Science**, 238:163-170, 1987

HOLLIDAY, R.; PUGH, J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science.**, 24: 87(4173):226, 1975.

HOLLYDAY, R. A mechanism for gene conversion in Fungi. *Genet. Res., Camb.*, 5: 282-304, 1964.

HOPKIN, M. Low levels of benzene damage health. **Nature**, (<http://nature.com/news/2004/041129/0411-9hml>). 2.004.

ISSA, J.P. CpG-island methylation in aging and cancer. **Curr. Top Microbiol Immunol.**, 249: 101-118, 2000.

JONES, P.A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science.**, 293: 1068-1083, 1992.

KAFER, E.; SCOTT, B. R.; DORN, G.L.; STAFFORD, R. *Aspergillus nidulans*: Systems and Results of Tests for Chemical Induction of Mitotic Segregation and Mutation . I. Diploid and Duplication Assay Systems. **Mut. Res.**, 98: 1-48, 1982.

KÄFER, E. Mitotic crossing over and nondisjunction in translocation heterozygotes of *Aspergillus*. **Genetics**, 82: 605-627, 1976.

KNIGHT, A.W.; KEENAN, P.O.; GODDARD, N.J.; FIELDEN, P.R.; WALMSLEY, R.M. A yeast-based cytotoxicity and genotoxicity assay for environmental monitoring using a novel portable instrumentation. **J. Environ. Monit.**, 6: 71-79, 2004.

KUNZ, B. A.; HAYNES, R. H. Phenomenology and genetic control of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mut. Res.**, 384: 33-44, 1981.

KURODA Y.; HARA Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mut. Res.**, 436:69-97, 1999.

LAIRD, P.W.; JAENISCH, R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. **Annu. Ver. Genet.**, 30: 441-464, 1996.

LAN, Q.; ZHANG, L.; LI, G.; VERMEULEN, R.; WEIMBERG, R.S.; DOSEMECI, M.; RAPPAPORT, S. M.; SHEN, M.; ALTER, B. P.; WU, Y.; KOPP, W.; WAIDYANATHA, S.; RABKIN, C.; GUO, W.; CHANOCK, S.; HAYES, R. B.; LINET, M.; KIM, S.; YIN, S.; ROTHMAN, N.; SMITH, M.T. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. **Science**, 306: 1774-1776, 2004.

LEE, H.P.; GOURLEY, L.; DUFFY, S.W.; ESTEVE, J.; LEE, J.; DAY, N.E. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. **Lancet**, 337:1197-11200. 1991.

LEWIN, B. The mystique of epigenetics. **Cell.**, 93: 301-303, 1998.

LHOAS, P.; Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with *p*-phenylalanine. **Nature, London**, 190: 744, 1961.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, 69: 915-926, 1992.

LINDSTROM, A.B.; YEOWELL-O'CONNELL, K.; WAIDYANATHA, S.; GOLDING, B.T.; TORNERO-VELEZ, R.; RAPPAPORT, S.M. Measurement of benzene oxide in the blood of rats following administration of benzene. **Carcinogenesis**, 18: 1637-1641, 1997.

LOFROTH, G.; STENSMAN, C.; BRANDHORST-SATZKORN, M. Indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter: smoking, cooking and incense burning. **Mut. Res.**, 261: 21-28, 1991.

LU, S. C.; HUANG Z. Z.; YANG, H.; MATO, J. M.; AVILA, M. A.; TSUKAMOTO, H. Changes in methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine homeostasis in alcoholic rat liver. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 279: G178-G185. 2000.

MAC EACHERN, L.; SNYDER, R.; LASKIN, D. L. Alterations in the morphology and functional activity of bone marrow phagocytes following benzene treatment of mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 117: 147-154, 1992.

MAJOR, J.; JAKAB, M.; KISS, G.; TOMPA, A. Chromosome aberration, sister-chromatid exchange, proliferative rate index, and serum thiocyanate concentration in smokers exposed to low-dose benzene. **Environ. Mol. Mutagen.**, 23:137-142, 1994.

MATO, J. M.; ALVAREZ, L.; ORTIZ, P.; PAJARES, M.A. S-adenosymethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. **Pharmacol. Ther.**, 7: 265: 280, 1997.

MATZKE, A.J.M.; NEUHUBER, F.; PARK, Y.D.; AMBROS, P.F.; MATZKE, M.A. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing *loci* contain multiple copies of methylated transgenes. **Mol. Gen. Genet.**, 244: 219-229, 1994.

MATZKE, M.; MATZKE, J. M.; KOOTER, J. M. RNA-guiding gene silencing. **Science**, 293:1081, 2001.

MATZKE, M.A.; MATZKE A.J.M. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? **Trends Genet.**, 11: 1-3, 1995.

MAYORGA M.E.; TIMBERLAKE W.E. The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wA* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. **Mol Gen Genet.**, 235: 205-212, 1992.

MAYORGA, M.E.; TIMBERLAKE, W.E. Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *wA* gene. **Genetics**, 126: 73-79, 1990.

MEYER, P. Understanding and controlling transgene expression. **Trends. Biotech.**, 13: 332-337, 1995.

MEYER, P.; HEIDMANN, I.; NIEDENHOF, I. Differences in DNA methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. **Plant J.** 4: 89-100, 1993.

MORPURGO, C. Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. **Aspergillus Newsletter.**, 2: 10, 1961.

MOULTON. T; CRENSHAW, T., HAO Y, MOOSIKASUWAN J, LIN N, DEMBITZER F, HENSLE T, WEISS L, MMMORROW L, LOEW T., KRAUS W., GERALD W., TYCKO B. Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients. **Nat Genet.**, 7:440-447, 1994

MULLIN, A.H.; NATARAJ, D.; REN, J.J.; MULLIN, D.A. Inhaled benzene increases the frequency and length of *lac* I deletion mutations in lung tissues of mice. **Carcinogenesis**, 19:1723-1733, 1998.

NAN, X.; CROSS, S.; BIRD, A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. **Novartis Found. Symp.** 214: 6-16, 1998.

NISHIMURA, M.; YOSHINO, K.; TOMITA, Y.; TAKASHIMA, S.; TANAKA, J.; NARISAWA, K.; KUROBANE, I. Central and peripheral nervous system pathology of homocystinuria due to 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Pediatr. Neurol.**, 1: 375-378, 1985

PIRES, L.T.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. A new method to detect potential genotoxic agents using mitotic crossing-over in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Brazil. J. Genet.**, 17: 371-376, 1994.

PIRES, L.T.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. Ribonucleic acid treatment alters gene expression in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Cell Mol. Biol.**, 44: 303-313, 1998.

PONTERCORVO, G.J.; ROPER, L.M.; HEMMONS, K.D.; MACDONALD, A.W.J. B. The genetics of *Aspergillus*. **Advances in Genetics**, 5: 141-238, 1953.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, 1: 17-20, 1985.

RANALDI, R.; BASSANI, B.; VILLANI, P.; LOMBARDI, C.C.; TANZARELLA, C.; PACCHIEROTTI, F. Measurement and characterization of micronuclei in cultured primary lung cells of mice following inhalation exposure to benzene. **Mutagenesis**, 13: 453-460, 1998.

RAZIN, A.; CEDAR, H. DNA methylation and gene expression. **Microbiol. Rev.** 55: 451-458, 1991.

RAZIN, A.; RIGGS, A.D. DNA methylation and gene function. **Science**, 210: 604-610, 1980.

RESS, N.B.; WITT, K.L.; XU, J.; HASEMAN, J.K.; BUCHER, J.R. Micronucleous induction in mice exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. **Mut. Res.**, 521:201-208, 2002.

RICHARDSON, B.; SCHEINBART L.; STRAHLER, J.; GROSS L.; HANASH S.; JOHNSON M. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic *lupus erythematosus* and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 33: 1665-1673, 1990.

ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. **Experimentia**, 8:2, 63-267, 1952.

ROSS, S. A. International Project-Coordinator. DNA methylation, diet and other epigenetic events and cancer prevention. **Nutr. Sc. Res. Group.**, 2002. <http://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/rfa-ca-03-016.html>

RUNION, H.E.; SCOTT, L.M. Benzene exposure in the United States 1978-1983: an overview. **Am. J. Ind. Med.**, 7:385-393, 1985.

SADO, T.; FENNER, M. H.; TAN, S.-S.; TAM, P.; SHIODA, T.; LI, E. X- inactivation in the mouse embryo deficient for *Dnmt1*: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X-inactivation. **Dev. Biol.**, 225: 294-303, 2000.

SEDGWICK, B. Repairing DNA-methylation damage. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, 5: 148-157, 2004.

SHINMOTO, H.; KOBORI, M.; TSUSHIDA, T.; SHINOHARA, K.; ANAN, T. Assessment of the mutagenicity on the TMV coat protein induced transgenic tomato. **Nippon Sho. Kag. Kaishi.** 42: 790-795, 1995 a.

SHINMOTO, H.; TOMIZAWA, A.; KOBORI, M.; TSUSHIDA, T.; SHINOHARA, K.; ANAN, T. Assessment of the mutagenicity on the TMV coat protein gene induced transgenic tomato by the *umu*-test. **Biosc. Biotech. And Biochem.**, 59: 2151-2152, 1995 b.

SINGH, S.M.; MURPHY, B. O'REILLY, R.L. Involvement of gene-diet/drug interaction in DNA methylation and its contribution to complex diseases: from cancer to schizophrenia. **Clin. Genet.**, 64: 451-460, 2003.

SOUSA, G. D. Efeito Genotóxico de vapor de mercúrio em *Aspergillus nidulans*. Um Modelo Biológico Para Eucariotos. Mestrado Em Ciências Genômicas e Biotecnológicas - Universidade Católica de Brasília. 105p, 2002.

SZYF, M. Targeting DNA methylation in cancer. **Ageing Res. Rev.**, 2: 299-328. 2003.

SZYF, M. The role of DNA methyltransferase 1 in growth control. **Front Biosci.** 6: D599-D609, 2001.

TAVARES, G. M.; PITANGA, K. C.; SILVA, M.A. T. **Soc. Bras. Nutr.**, 15: 321-325, 2000.

THILGHMAN, S.M. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell*, 96: 185-193, 1999.

TILBURN, J.; ROUSSEL, F.; SCAZZOCCHIO, C. Insertional and cloning of the *wA* gene of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, 126: 81-90, 1990

TIMBERLAKE, W.; MARSHALL, M.A. Genetics engineering of filamentous *fungi*. **Science**, 244: 1313-1317, 1998.

TIMBERLAKE, W.E.; MARSHALL, M.A., Genetic engineering of filamentous *fungi*. **Science**, 244: 1313-1317, 1989.

TOSE, H.; NEVES, A. R. N.; NEVES, M. B. Valor da soja como alimento funcional nas doenças cardiovasculares atrosclóticas. **Soc. Brás. Nutr.** 15: 316-320, 2000.

TUO, J.; LOFT, S.; THOMSEN, M.S.; POULSEN, H.E. Benzene-induced genotoxicity in mice in vivo detected by the alkaline comet assay: reduction by CYP2E1 inhibition. **Mut. Res.**, 368:213-219, 1996.

VACHTENHEIM, J.; HORAKOVA, I.; NOVOTNA, H. Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer. **Cancer Res.**, 54: 1145-1148. 1994.

VAN DE VATE, C.; JANSEN, G.J.O. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. **Genet. Res.**, 31:29-52, 1978.

VAN DEN VEYVER, I. B. Genetic effects of methylation diets. **Ann, Rev. Nutr.**, 22: 255-282, 2002.

WAINFAN, E.; DIZIK, M.; STENDER, M.; CHRISTMAN, J. Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer promoting, methyl-deficient diets. **Cancer Res.** 49: 4094-4097, 1989.

WARD J.B.;MENHEUSER M.M.; MANUJAM,V. M., MORRIS D. L.; WHORTON E. B.; LEGATON M. S. The mutagenic effect of low level sub-acute inhalation exposure to benzene in CD-1 mice. **Mutat Res**, 268:49–57, 1992.

WATANABE, A.; FUJI, I.; SANKAWA, U.; MAYORGA, M.E.; TIMBERLAKE, W.E.; EBIZUKA, Y. Re-identification of *Aspergillus nidulans* wA gene to code for a polyketide synthase of naphthopyrone. **Tetrahedron Lett.**, 40: 91-94, 1999.

WATANABE, A.; ONO, Y.; FUFU, I.; SANKAWA, U.; MAYORGA, M.E.; TIMBERLAKE, W.E.; EBIZUKA, Y. Product of polyketide synthase coded by *Aspergillus nidulans* wA gene. **Tetrahedron Lett.** 39: 7733-7736, 1998.

WHITELAW, E.; MARTIN, D. I. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. **Nat. Genet.**, 27: 361-365, 2001.

WU, A.H.; ZIEGLER R.G.; NOMURA A.M.; WEST D.W.; KOLONEL L.N.; HORN-ROSS P.L.; HOOVER R.N.; PIKE M.C. Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian-Americans. **Am. J. Clin. Nutr.**, 68: 1437S-1443S, 1998.

ZHENG W.; DAI Q.; CUSTER L.J.; SHU X.O.; WEN W.Q.; JIN F.; FRANKE A.A. Urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.**, 8:35-40, 1999.

ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, F. D.; MELO, I. S.; POLI, P.; ZUCCHI, T. M. A. D ZUCCHI. A short-term test adapted to detect the genotoxic effects of environmental volatile pollutants (benzene fumes) using the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **J. Environ. Monit.**, 7:598 – 602, 2005.

ZUCCHI, T. M. A .D. Location of suppressor of *methA17* in 30 mutant of *Aspergillus*. **Brazil. J. Genet.**, 14: 425-443, 1990b.

ZUCCHI, T. M. A. D. Isolation of putative recombination mutants of *A. nidulans*. **Braz. J. Genet.**, 13: 409-443, 1990 a.

ZUCCHI, T.M.A.D; PIRES, L. T. A. Microrganismos Indicadores de Poluição Ambiental. *In* Microbiologia Ambiental. Melo, I. S.; Azevedo, J.L. EMBRAPA (SP)-ISSN 1413 0084. 257-413, 1997.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE **AB**REVIATURAS E **S**IGLAS

°C	graus Celsius
μL	microlitro
μM	micromolar
2n ^R	diplóides recombinantes
AMPc	adenosina mono fosfato cíclico
ATP	adenosina tri fosfato
BO	óxido de benzeno
BSA	albumina bovina sérica
CpG	dinucleotídeo alvo de metilação
CTAB	protocolo de extração de DNA
C1	controles dos diplóides, em MC sem tratamento e analisados de modo convencional
C2	controle dos diplóides (originais ou setores) crescidos em MM, sem tratamento e analisados de modo convencional
DAAB	diazoaminobenzeno
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dnmts	DNA metil transferases
<i>Dp(II-I)</i>	linhagem haplóide de <i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Dp(II-I)/UT184</i>	linhagem diplóide de <i>Aspergillus nidulans</i>
dsDNA	DNA dupla fita (Double Strand DNA)
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FDA	Food and Drug Administration (Órgão Governamental EUA, de controle de alimentos e produtos químicos)FR
	freqüência de recombinação

G2	fase do ciclo de divisão celular
GIS	Gene Inactivation System (Sistema de Inativação Gênica)
HCl	ácido clorídrico
HDACs	enzimas histona-deacetilases
HDL	high density cholesterol (Colesterol de alta densidade)
HI	índice de homozigotização (Indicador de crossing-over mitótico em células diplóides)
i.p.	intra peritoneal
Kb	quilobase
LDL	low density cholesterol (Colesterol de Baixa Densidade)
LOI	loss of imprinting (Perda de "Imprinting")
M	molar
mA	miliampere
MBen	tratamento de <i>Aspergillus nidulans</i> em crescimento em meio mínimo
MC	meio completo
mC	metil citosina ou citosina metilada
mg	miligrama
mg/mL	micrograma por mililitro
MIP	mutation induced pre-meiotically (Mutação induzida pr�-meiotica)
mL	mililitro
MM	meio mínimo
mM	milimolar
MNNG	<i>N</i> -Metil- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
MSo	diplóide de <i>A. nidulans</i> em meio contendo soja convencional

MSoBen	diplóide de <i>A. nidulans</i> em meio contendo soja convencional exposto ao vapor de benzeno
MsoT	diplóide de <i>A. nidulans</i> em meio contendo de soja transgênica (25%)
MSoTBen	diplóide de <i>A. nidulans</i> em meio contendo soja transgênica (25%) exposto ao vapor de benzeno
MTHFR	metilenotetrahidrofolato redutase
p/v	peso por volume
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia de polimerase
pFA	<i>p</i> -fluorofenilalanina
pH	potencial de Hidrogênio
PM	peso molecular
r.p.m.	rotações por minuto
RAPD	reação de amplificação ao acaso de DNA polimórfico
RIGS	repeat induced gene silencing (Silenciamento gênico induzido por “repeats”)
RIP	repeat induced point mutation (Mutação de Ponto Induzida por “repeats”)
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SAH	S-adenosil homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina

SCGE	Teste Cometa (Single Cell Gel Eletrophoresis)
SDS	dodecilsulfato de sódio
SM	meio de cultura seletivo
SPC	S-fenilcisteína
ssDNA	DNA simples fita (Single strand DNA)
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
UT184	linhagem haplóide de <i>Aspergillus nidulans</i> (Estoque de Utrecht)
UT196	linhagem haplóide de <i>Aspergillus nidulans</i> (Estoque de Utrecht)
UT448	linhagem haplóide de <i>Aspergillus nidulans</i> (Estoque de Utrecht)
UT448//UT184	linhagem diplóide de <i>Aspergillus nidulans</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

A	adenina
C	citosina
g	grama
G	guanina
L	litro
M	molar: mol/L
T	timina
V	volts

APÊNDICE

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

Tabela 1. Controle C1 (Convencional) Diplóide UT448//UT184 Haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 2. Diplóide recombinante UT448//UT184 em MM (C2) Haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 3. Diplóide recombinante UT448//UT184 em MSo e haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 4. Diplóide recombinante UT448//UT184 20 s com Benzeno em MSo e Haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 5. Diplóide recombinante UT448//UT184 em MSoT e haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 6. Diplóide recombinante UT448//UT184 tratado 20 s com Benzeno em MSoT e Haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 7. Controle (Convencional) Diplóide *Dp* (II-I)//UT184 Haploidizado espontaneamente

Tabela 7 a. Diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado com 20 s Benzeno em MM e Haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 8. Diplóide (C2) recombinante *Dp* (II-I)//UT184 MM e Haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 9. Diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado 5 s com Benzeno em MM e Haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 10. Diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado 15 s com Benzeno em MM e Haploidizado em MC + *pFA*.

Tabela 11. Diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 em MSo e Haploidizado em MC + *pFA*

Tabela 12. Diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 tratado 20 s com Benzeno em MSo e Haploidizado em MC + pFA

Tabela 13. Diplóide recombinante *Dp* (II-I)//UT184 em MSoT e haploidizado em MC + pFA

Tabela 14. Diplóid recombinante *Dp* (II-I)//UT184 em MSoTBen 20 s com Benzeno e haploidizado em MC + pFA

Tabela 15. Resultados brutos de Cluster Analysis (Jaccard's Coefficient) UT448//UT184 e derivados $2n^R$

Tabela 16. Resultados brutos de Cluster Analysis (Simple matching coefficient) UT448//UT184 e derivados $2n^R$

Tabela 17. Resultados brutos de Cluster Analysis (Jaccard's coefficient) *Dp* (II-I)//UT184 e derivados $2n^R$

Tabela 18. Resultados brutos de Cluster Analysis (Simple Matching Coefficient) UT448//UT184 e derivados

Tabela 19. Análise meiótica controle UT448 X UT196

Tabela 20. Análise meiótica UT448 X UT196 hipometilado com 5-azaC

Tabela 21. Análise meiótica UT448 X UT196 hipometilado com suspensão de *mer30*

Documento 22. Laudo da Análise de sementes de soja fornecido pela SGS do Brasil

NOME: Tabela 1 - Controle (Convencional) Duplicado UT448/UT184 Haploizado em MC + pFA DATA: 2002

IDENTIFICAÇÃO: 448 x 184 (81 colonias - 4 placas)

Legenda: _ menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _ maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

448 184	ribo	+	paba	+	bio	+	w	+	pyro	+	tio	+	gal	+	nic	+	ac	+	cha (33)
+	ribo	58	23	0	23	2	21	13	10	13	10	9	14	15	8	6	17	9	1
+	paba	17.3%	37	37	44	2	35	21	16	17	20	14	23	24	13	10	27	9	7
+	bio	21.0%				36	45	22	14	15	21	18	23	23	13	10	26	8	6
+	w	44.4%		3.7%		50.6%	48	33	14	19	16	8	25	16	17	7	26	23	10
pyro	+	59.3%		51.9%		48.1%		49.4%	22	26	24	21	27	21	27	14	34	0	0
tio	+	53.1%		50.6%		49.4%		50.6%	36	45	27	18	32	18	27	14	31	13	6
gal	+	58.0%		53.1%		51.9%		43.2%		40.7%	49.4%	29	52	23	29	14	38	19	6
nic	+	63.0%		67.9%		66.7%		53.1%		43.2%	51.9%		46.9%	37	44	9	35	15	2
ac	+	60.5%		63.1%		54.3%		50.6%		53.1%	49.4%		44.4%	42.0%		21	60	17	9
cha	+	54.5%		36.4%		36.4%		69.7%		51.5%	24.2%		69.7%	69.7%			54.5%	23	10

NOME: Tabela 1 - Controle (Convencional) Diploide UT448//UT184 Haploidizado em MC + pFA
DATA: 2002
IDENTIFICAÇÃO: 448 x 184 (81 colonias - 4 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ nic+ tio+ gal+ ac+

Placa 4	rib	pab	bio	pyr	nic	tio	gal	ac
1	V	-	-	+	-	+	-	+
2	V	-	-	-	-	+	+	+
3	V	-	-	+	+	-	-	-
4	V	+	+	+	-	+	-	+
5	V	+	+	+	+	-	+	+
6	V	+	+	-	-	-	+	-
7	N	-	-	-	-	-	-	-
8	N	-	-	-	-	-	-	-
9	N	-	-	-	-	-	-	-
10	N	-	-	-	-	-	-	-
11	N	-	-	-	-	-	-	-
12	N	-	-	-	-	-	-	-
13	N	-	-	-	-	-	-	-
14	N	-	-	-	-	-	-	-
15	N	-	-	-	-	-	-	-
16	N	-	-	-	-	-	-	-
17	N	-	-	-	-	-	-	-
18	N	-	-	-	-	-	-	-
19	N	-	-	-	-	-	-	-
20	N	-	-	-	-	-	-	-
21	N	-	-	-	-	-	-	-
22	N	-	-	-	-	-	-	-
23	N	-	-	-	-	-	-	-
24	N	-	-	-	-	-	-	-
25	N	-	-	-	-	-	-	-

NOME: Tabela 2 - Diploide Recombinante UT448/UT184 em MM e Haploidizado em MC + pFA
DATA: 11/4/00
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (228 colonias - 10 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ nic+ tio+ gal+ lac+ ac+

Placa 1										Placa 2										Placa 3									
	rib	pab	bio	pyr	nic	tio	gal	lac	ac		rib	pab	bio	pyr	nic	tio	gal	lac	ac		rib	pab	bio	pyr	nic	tio	gal	lac	ac
1	C	-	+	+	+	-	+	+	-	1	C	-	+	+	+	-	+	+	-	1	B	-	-	+	+	-	-	+	+
2	B	-	+	+	+	-	+	+	-	2	B	-	-	+	+	-	+	+	-	2	B	+	+	+	+	-	-	+	-
3	C	-	+	+	+	-	+	+	-	3	B	+	+	+	+	-	+	+	+	3	V	+	+	+	+	-	+	+	+
4	C	-	+	+	+	-	+	+	-	4	B	-	-	-	-	-	+	-	-	4	C	+	+	+	+	-	+	+	+
5	B	-	-	-	+	-	+	+	-	5	B	-	-	-	-	-	+	-	-	5	B	+	+	+	+	-	+	+	+
6	C	-	+	+	+	-	+	+	-	6	C	-	+	+	+	-	+	+	+	6	V	-	-	-	-	-	+	+	+
7	B	-	-	-	-	-	+	+	-	7	B	-	-	-	-	-	+	+	-	7	C	-	+	-	-	-	+	+	+
8	C	-	+	+	+	-	+	+	-	8	V	+	+	+	+	-	+	+	+	8	B	+	+	+	+	-	+	+	+
9	C	-	-	+	+	-	+	+	-	9	C	-	-	+	+	-	+	+	+	9	B	+	+	+	+	-	+	+	+
10	B	+	+	+	+	-	+	+	+	10	C	-	-	+	+	-	+	+	+	10	C	-	+	+	+	-	+	+	+
11	C	-	+	+	+	-	+	+	-	11	B	-	-	-	-	-	+	+	-	11	C	-	+	-	+	-	+	+	+
12	C	-	+	+	+	-	+	+	-	12	B	-	-	-	-	-	-	-	-	12	C	+	+	+	+	-	+	+	+
13	C	-	+	+	+	-	+	+	-	13	B	-	-	-	-	-	+	+	-	13	B	+	+	+	+	-	+	+	-
14	B	-	-	-	-	-	+	+	-	14	B	-	-	-	-	-	+	+	-	14	B	-	-	-	+	-	-	+	+
15	B	+	+	+	+	-	+	+	+	15	C	-	-	+	+	-	+	+	-	15	B	+	+	+	+	-	+	+	+
16	C	-	+	+	+	-	+	+	-	16	C	+	+	+	+	-	+	+	+	16	B	+	+	+	+	-	+	+	+
17	B	+	+	+	+	-	+	+	+	17	C	-	+	+	+	-	+	+	+	17	V	+	+	+	+	-	+	+	+
18	C	-	+	+	+	-	+	+	-	18	N	-	-	-	-	-	-	-	-	18	C	-	+	+	+	-	+	+	+
19	C	-	-	-	+	-	+	+	-	19	N	-	-	-	-	-	-	-	-	19	B	-	+	+	+	-	+	+	-
20	C	-	+	+	+	-	+	+	-	20	B	+	+	+	+	-	+	+	+	20	C	-	+	+	+	-	+	+	+
21	C	-	+	+	+	-	+	+	-	21	C	-	+	+	+	-	+	+	+	21	B	-	-	-	-	-	+	+	-
22	B	-	+	+	+	-	+	+	-	22	C	+	+	+	+	-	+	+	+	22	C	-	+	+	+	-	+	+	+
23	B	-	-	-	-	-	+	+	-	23	C	-	+	+	+	-	+	+	-	23	V	+	+	+	+	-	+	+	+
24	B	-	-	-	-	-	+	+	-	24	B	+	+	+	+	-	+	+	-	24	B	-	+	+	-	-	+	+	-
25	B	-	-	-	-	-	+	+	-	25	B	-	-	-	-	-	+	+	+	25	C	+	+	+	+	-	+	+	+

NOME: Tabela 2 - Diploide Recombinante UT448/UT184 em MM e Haploidizado em MC + pFA
DATA: 11/4/00
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (228 colonias - 10 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ nic+ tio+ gal+ lac+ ac+

Placa 4										Placa 5										Placa 6													
	rib	pab	bio	pyr	nic	tio	gal	lac	ac				rib	pab	bio	pyr	nic	tio	gal	lac	ac				rib	pab	bio	pyr	nic	tio	gal	lac	ac
1	V	+	+	+	+	-	+	+	+			1	B	-	-	-	+	-	+	-	-			1	C	+	+	+	+	+	-	+	+
2	V	+	+	+	+	-	+	+	+			2	N	-	-	-	-	-	-	-	-			2	V	+	+	+	+	+	-	+	+
3	V	+	+	+	+	-	+	+	+			3	B	+	+	+	+	-	+	+	+			3	V	+	+	+	+	+	-	+	+
4	V	+	+	+	+	-	+	+	+			4	N	-	-	-	-	-	-	-	-			4	C	+	+	-	+	+	-	+	+
5	V	+	+	+	+	-	+	+	+			5	B	-	-	-	-	-	-	+	-			5	V	+	+	+	+	+	-	+	+
6	V	+	+	+	+	-	+	+	+			6	B	+	+	+	-	-	+	-	-			6	B	+	+	+	+	+	-	+	+
7	C	-	+	+	+	-	+	+	+			7	N	-	-	-	-	-	-	-	-			7	B	+	+	+	+	+	-	+	+
8	V	+	+	+	+	-	+	+	+			8	N	-	-	-	-	-	-	-	-			8	V	+	+	+	+	+	-	+	+
9	V	+	+	+	+	-	+	+	+			9	N	-	-	-	-	-	-	-	-			9	V	+	+	+	+	+	-	+	+
10	B	-	-	-	-	-	+	+	+			10	C	+	-	+	+	-	+	-	-			10	C	+	+	+	+	+	-	+	+
11	V	+	+	+	+	-	+	+	+			11	N	-	-	-	-	-	-	-	-			11	C	+	+	+	+	+	-	+	+
12	V	+	+	+	+	-	+	+	+			12	N	-	-	-	-	-	-	-	-			12	B	+	+	+	+	+	-	+	+
13	V	+	+	+	+	-	+	+	+			13	N	-	-	-	-	-	-	-	-			13	C	-	+	-	+	+	-	+	+
14	V	+	+	+	+	-	+	+	+			14	N	-	-	-	-	-	-	-	-			14	V	+	+	+	+	+	-	+	+
15	V	+	+	+	+	-	+	+	+			15	N	-	-	-	-	-	-	-	-			15	C	+	+	+	+	+	-	+	+
16	V	+	+	+	+	-	+	+	+			16	B	-	+	+	+	-	+	+	+			16	V	+	+	+	+	+	-	+	+
17	V	+	+	+	+	-	+	+	+			17	N	-	-	-	-	-	-	-	-			17	B	+	+	+	+	+	-	+	+
18	V	+	+	+	+	-	+	+	+			18	N	-	-	-	-	-	-	-	-			18	V	+	+	+	+	+	-	+	+
19	V	+	+	+	+	-	+	+	+			19	N	-	-	-	-	-	-	-	-			19	V	+	+	+	+	+	-	+	+
20	B	-	-	-	-	-	+	+	+			20	B	-	-	-	-	-	+	-	-			20	C	-	+	+	+	+	-	+	+
21	V	+	+	+	+	-	+	+	+			21	B	-	+	+	-	-	+	+	-			21	C	-	+	+	+	+	-	+	+
22	V	+	+	+	+	-	+	+	+			22	N	-	-	-	-	-	-	-	-			22	V	+	+	+	+	+	-	+	+
23	B	+	+	+	+	-	+	+	+			23	B	-	-	-	-	-	+	+	-			23	C	-	+	+	+	+	-	+	+
24	B	-	-	-	-	-	+	+	+			24	N	-	-	-	-	-	-	-	-			24	V	+	+	+	+	+	-	+	+
25	C	-	+	+	+	-	+	+	+			25	C	-	+	+	+	+	+	+	+			25	B	-	+	+	+	+	-	+	+

NOME: Tabela 2 - Diploide Recombinante UT448//UT184 em MM e Haploidizado em MC + pFA
DATA: 11/4/00
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (228 colonias - 10 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ nic+ tio+ gal+ lac+ ac+

Placa 10	rib	pab	bio	pyr	nic	tio	gal	lac	ac
1	B	+	+	+	+	-	+	+	+
2	B	+	+	+	+	-	+	+	+
3	C	+	+	+	+	-	+	+	+
4	V	+	+	+	+	-	+	+	+
5	B	+	+	+	+	-	+	+	+
6	V	+	+	+	+	-	+	+	+
7	B	+	+	+	+	-	+	+	+
8	B	+	+	+	+	-	+	+	+
9	C	-	-	-	-	-	-	-	-
10	V	+	-	-	+	+	+	+	+
11	V	+	+	+	+	-	+	+	+
12	V	+	+	+	+	-	+	+	+
13	B	+	+	+	+	-	+	+	+
14	C	-	+	-	+	-	-	+	+
15	V	+	+	+	+	-	+	+	+
16	C	-	+	-	+	-	+	+	+
17	B	+	-	-	+	-	+	+	+
18	B	-	-	+	+	-	+	+	-
19	V	+	+	+	+	-	+	+	+
20	V	+	+	+	+	-	+	+	+
21	N	-	-	-	-	-	-	-	-
22	N	-	-	-	-	-	-	-	-
23	N	-	-	-	-	-	-	-	-
24	N	-	-	-	-	-	-	-	-
25	N	-	-	-	-	-	-	-	-

NOME: Tabela 3 - Díploide Recombinante UT448/UT184 em MSo e Haplóidizado em MC + pFA DATA: 31/10/2002

IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (100 colonias - 4 placas)

Legenda: _ menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _ maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

UT448	ribo	paba	bio	w	+	met	pyro	lac	+	tio	gal	+	nic	+	ac	+	cha
UT184																	(99)
+	98	6	92	1	97	1	97	1	97	1	97	1	97	1	94	4	96
ribo	2	1	1	0	2	1	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	1
+	7.0%	93	0	93	1	92	92	1	92	0	93	0	92	1	89	4	92
paba		7	2	5	0	7	7	0	6	1	6	1	0	7	7	0	5
+	2.0%		98	1	97	97	97	1	98	0	98	0	97	94	4	97	0
bio			2	0	2	2	0	2	1	1	1	1	0	2	2	0	0
+	3.0%			99	98	98	1	98	1	97	2	98	1	98	95	4	97
w			3.0%	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
met				98.0%	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
+	99.0%	92.0%	97.0%		99	98	1	98	1	97	2	98	1	98	95	4	96
pyro				98.0%		2.0%	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
+	97.0%	92.0%	97.0%		99	98	1	98	1	97	2	98	1	98	95	4	96
lac				98.0%		2.0%		1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
+	97.0%	94.0%	99.0%		99	98	1	98	1	98	1	99	0	98	95	4	97
tio				97.0%		3.0%		1.0%	2	98	1	1	0	2	2	0	0
+	98.0%	95.0%	100.0%			3.0%	3.0%	1.0%	98	0	98	0	1	97	94	4	97
gal				98.0%		2.0%		0.0%		1.0%		1	0	1	1	0	1
+	97.0%	94.0%	99.0%			2.0%	2.0%	0.0%		99		99	1	98	95	4	97
nic				2.0%		98.0%	98.0%	98.0%		97.0%		98.0%	1	99	95	4	96
+	3.0%	8.0%	3.0%			5.0%	5.0%	5.0%		6.0%		5.0%		1	1	0	1
ac				95.0%		94.0%	94.0%	5.0%		6.0%		5.0%		95.0%	96	4	0
+	94.0%	89.0%	94.0%			98.0%	98.0%	98.0%		0.0%		99		95.0%	93	93	2
cha				98.0%		100.0%	100.0%	3.0%		0.0%		1.0%		97.0%	6.1%	97	2
+	98.0%	94.9%	100.0%			3.0%	3.0%	1.0%		0.0%		1.0%		97.0%	6.1%	97	1

NOME: Tabela 3 - Diploide Recombinante UT448/UT184 em MSo e Haploidizado em MC + pFA
DATA: 31/10/2002
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (100 colonias - 4 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ met+ nic+ tio+ gal+ lac+ ac+

Placa 4	rib	pab	bio	pyr	met	nic	tio	gal	lac	ac
1	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
8	V	+	-	+	+	-	+	+	+	+
9	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+
11	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
12	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
13	V	+	-	+	+	-	+	+	+	+
14	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
15	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
16	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
17	V	+	-	+	+	-	+	+	+	+
18	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
19	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
20	V	+	-	+	+	-	+	+	+	+
21	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
22	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
23	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	V	+	-	+	+	-	+	+	+	+
25	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+

NOME: Tabela 4 - Diploide Recombinante (MSoBen). UT448 x UT184 20" com Benzene em MSO e haploidizado em MC + pFA
DATA: 31/10/2002
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (100 colonias - 4 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w+ cha- ribo+ paba+ bio+ pyro- met- nic- tio- gal- lac- ac-

Placa 4	rib	pab	bio	pyr	met	nic	tio	gal	lac	ac
1	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
5	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
6	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
7	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
8	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
9	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+
11	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
12	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
13	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
14	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
15	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
16	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
17	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
18	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
19	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+
20	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+
21	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
22	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
23	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
24	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+
25	V	+	+	+	+	+	-	+	+	+

NOME: Tabela 5 - Dipeptídeo Recombinante UT448/184 em MSOT e Haplótipo em MC + pFA DATA: 31/10/2002

IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (100 colonias - 4 placas)

Legenda: _ menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%), _ maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

UT448 UT184	ribo	+	paba	+	bio	+	w	+	+	met	+	pyro	+	lac	+	tio	+	gal	+	nic	+	ac	+	cha (99)		
+	99	1	98	1	98	0	99	0	98	1	98	1	98	1	98	1	98	1	98	1	98	98	1	99	0	
ribo	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	
+	2.0%	99	1	98	1	98	1	98	98	1	98	1	98	1	98	1	98	1	98	1	98	98	1	98	0	
paba		1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	
+	2.0%		2.0%		99	1	98	98	98	1	98	1	98	1	98	1	98	1	98	1	98	98	1	98	0	
bio				1		0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	
+	0.0%		2.0%				99	98	98	1	98	1	98	1	98	1	98	1	98	1	98	98	1	99	0	
w					2.0%	1		1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	
met										1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	
+	98.0%	98.0%			98.0%		98.0%		98.0%	99		98	1	98	1	98	1	98	1	98	98	1	98	0	0	
pyro											1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	
+	98.0%	98.0%			98.0%		98.0%		98.0%	2.0%		99		98	1	98	1	98	1	98	98	1	98	0	0	
lac														1		1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
+	98.0%	98.0%			98.0%		98.0%		98.0%	2.0%		2.0%		99		98	1	98	1	98	98	1	98	0	0	
tio																1		1	0	0	1	0	1	0	0	
+	98.0%	98.0%			98.0%		98.0%		98.0%	2.0%		2.0%		2.0%		99		98	1	1	98	98	1	98	0	
gal																		1		0	1	0	1	0	0	
+	98.0%	98.0%			98.0%		98.0%		98.0%	2.0%		2.0%		2.0%		2.0%		99		1	98	98	1	98	0	0
nic																										
+	2.0%	2.0%			2.0%		2.0%		2.0%	98.0%		98.0%		98.0%		98.0%		98.0%		99	98	1	98	0	0	
ac																				1	1	0	1	0	0	
+	98.0%	98.0%			98.0%		98.0%		98.0%	2.0%		2.0%		2.0%		2.0%		2.0%		98.0%	99	1	1	0	0	
cha																										
+	100.0%	99.0%			99.0%		100.0%		1.0%			1.0%		1.0%		1.0%		1.0%		99.0%		1.0%	99	1	0	

NOME: Tabela 5 - Duplicíde Recombinante UT448//184 em MSoT e Haploidizado em MC + pFA
DATA: 31/10/2002
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (100 colonias - 4 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ met+ nic+ tio+ gal+ lac+ ac+

Placa 4	rib	pab	bio	pyr	met	nic	tio	gal	lac	ac
1	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
7	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
8	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
9	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
11	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
12	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
13	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
14	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
15	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
16	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
17	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
18	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
19	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
20	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
21	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
22	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
23	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	V ₆	+	+	+	+	-	+	+	+	+
25	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+

NOME: Tabela 6 - Duplicado Recombinante (MSOTBen) UT448//UT184 tratado 20" com Benzeno em MSOT e Haplotizado em MC + pFA

DATA: 31/10/2002

IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (124 colonias - 5 placas) - CONTROLE

LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ met+ nic+ tio+ gal+ lac+ ac+

Placa 1										Placa 2										Placa 3									
rib pab bio pyr met nic tio gal lac ac										rib pab bio pyr met nic tio gal lac ac										rib pab bio pyr met nic tio gal lac ac									
1	V	+	+	+	+	+	+	+	+	1	V	+	+	+	+	+	+	+	+	1	C	+	+	+	+	+	+	+	+
2	V	+	+	+	+	+	+	+	+	2	V	+	+	+	+	+	+	+	+	2	N	+	+	+	+	+	+	+	+
3	V	-	+	+	+	+	+	+	+	3	V	+	+	+	+	+	+	+	+	3	V	+	+	+	+	+	+	+	+
4	V	+	+	+	+	+	+	+	+	4	V	+	+	+	+	+	+	+	+	4	V	+	+	+	+	+	+	+	+
5	V	+	+	+	+	+	+	+	+	5	V	+	+	+	+	+	+	+	+	5	V	+	+	+	+	+	+	+	+
6	V	+	+	+	+	+	+	+	+	6	V	+	+	+	+	+	+	+	+	6	V	+	+	+	+	+	+	+	+
7	V	+	+	+	+	+	+	+	+	7	C	+	+	+	+	+	+	+	+	7	V	+	+	+	+	+	+	+	+
8	V	+	+	+	+	+	+	+	+	8	V	+	+	+	+	+	+	+	+	8	V	+	+	+	+	+	+	+	+
9	V	+	+	+	+	+	+	+	+	9	V	+	+	+	+	+	+	+	+	9	V	+	+	+	+	+	+	+	+
10	V	+	+	+	+	+	+	+	+	10	V	+	+	+	+	+	+	+	+	10	V	+	+	+	+	+	+	+	+
11	V	+	+	+	+	+	+	+	+	11	V	+	+	+	+	+	+	+	+	11	V	+	+	+	+	+	+	+	+
12	V	+	+	+	+	+	+	+	+	12	V	+	+	+	+	+	+	+	+	12	V	+	+	+	+	+	+	+	+
13	V	+	+	+	+	+	+	+	+	13	V	+	+	+	+	+	+	+	+	13	V	+	+	+	+	+	+	+	+
14	V	+	+	+	+	+	+	+	+	14	V	+	+	+	+	+	+	+	+	14	V	+	+	+	+	+	+	+	+
15	V	+	+	+	+	+	+	+	+	15	V	+	+	+	+	+	+	+	+	15	V	+	+	+	+	+	+	+	+
16	V	+	+	+	+	+	+	+	+	16	V	+	+	+	+	+	+	+	+	16	V	+	+	+	+	+	+	+	+
17	V	+	+	+	+	+	+	+	+	17	V	+	+	+	+	+	+	+	+	17	V	+	+	+	+	+	+	+	+
18	V	+	+	+	+	+	+	+	+	18	V	+	+	+	+	+	+	+	+	18	V	+	+	+	+	+	+	+	+
19	V	+	+	+	+	+	+	+	+	19	V	+	+	+	+	+	+	+	+	19	V	+	+	+	+	+	+	+	+
20	V	+	+	+	+	+	+	+	+	20	V	+	+	+	+	+	+	+	+	20	V	+	+	+	+	+	+	+	+
21	V	+	+	+	+	+	+	+	+	21	V	+	+	+	+	+	+	+	+	21	V	+	+	+	+	+	+	+	+
22	V	+	+	+	+	+	+	+	+	22	V	+	+	+	+	+	+	+	+	22	V	+	+	+	+	+	+	+	+
23	V	+	+	+	+	+	+	+	+	23	V	+	+	+	+	+	+	+	+	23	V	+	+	+	+	+	+	+	+
24	V	+	+	+	+	+	+	+	+	24	V	+	+	+	+	+	+	+	+	24	V	+	+	+	+	+	+	+	+
25	V	+	+	+	+	+	+	+	+	25	V	+	+	+	+	+	+	+	+	25	V	+	+	+	+	+	+	+	+

NOME: Tabela 6 - Diploide Recombinante (MSoTBen) UT448//UT184 tratado 20" com Benzeno em MSOT e Haploidizado em MC + pFA
DATA: 31/10/2002
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT184 (124 colonias - 6 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ met+ nic+ tio+ gal+ lac+ ac+

Placa 4												Placa 5											
rib pab bio pyr met nic tio gal lac ac												rib pab bio pyr met nic tio gal lac ac											
1	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	2	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	3	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	4	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	5	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
6	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	6	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
7	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	7	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
8	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	8	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
9	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	9	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	10	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
11	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	11	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
12	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	12	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
13	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	13	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	14	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
15	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	15	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
16	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	16	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
17	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	17	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
18	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	18	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
19	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	19	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
20	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	20	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
21	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	21	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
22	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	22	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
23	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	23	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
24	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	24	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
25	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	25	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

NOME: Tabela 7. Análise mitótica do diplóide Dp (II-I)/UT184 em MM e haploideizado em MC+pFA
DATA: 02/24/2002
IDENTIFICAÇÃO: Dp (II-I) x UT184 (250 colonias - 10 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ nic+ tio+ lac+ ac+

Placa 10		rib	pab	bio	pyr	nic	tio	lac	ac
1	C	.	+	+	+	+	+	+	+
2	C	.	+	+	+	+	+	+	+
3	C	.	+	+	+	+	+	+	+
4	C	.	+	+	+	+	.	+	+
5	C	.	+	+	+	.	+	+	+
6	B	.	+	+	+	+	+	+	+
7	B	+	+	+	+	+	+	+	+
8	B	+	+	+	+	+	+	+	+
9	B	+	+	+	+	+	+	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	+	+
11	B	+	+	+	+	+	.	+	+
12	B	+	+	+	+	+	+	+	+
13	B	+	+	+	+	+	+	+	+
14	B	+	+	+	+	+	+	+	+
15	B	+	+	+	+	+	+	+	+
16	B	+	+	+	+	+	+	+	+
17	B	+	.	+	+	+	+	+	+
18	B	+	+	+	+	+	+	+	+
19	B	+	+	+	+	+	+	+	+
20	B	+	+	+	+	+	+	+	+
21	B	+	+	+	+	+	+	+	+
22	B	+	+	+	+	+	+	+	+
23	B	+	+	+	+	+	+	+	+
24	B	+	+	+	+	+	+	+	+
25	B	+	+	+	+	+	+	+	+

NOME: Tabela 9 - Duplicado Recombinante DP(II-I)/UT184 tratado 5" com Benzeno em MM e Haploidizado em MC + pFA
DATA: 14/09/00
IDENTIFICAÇÃO: DP(II-I) x UT184 (121 colonias - 6 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- cha+ ribo- paba- bio- pyro+ nic+ gal+ lac+ ac+

Placa 1										Placa 2										Placa 3									
	rib	pab	bio	pyr	nic	gal	lac	ac			rib	pab	bio	pyr	nic	gal	lac	ac			rib	pab	bio	pyr	nic	gal	lac	ac	
1	V	-	-	-	+	+	+	+	1	B	-	-	-	+	-	-	+	+	1	B	+	+	+	-	+	-	+	+	
2	C	-	+	+	-	-	-	-	2	B	+	+	-	+	+	+	+	+	2	V	-	-	-	+	+	+	+	+	
3	B	-	+	+	-	+	+	+	3	B	-	-	-	+	+	+	+	+	3	B	-	+	-	+	+	-	+	+	
4	N	-	-	-	-	-	-	-	4	V	+	+	+	-	+	-	+	+	4	B	+	+	+	-	-	-	-	-	
5	B	-	+	-	+	+	+	+	5	B	+	+	+	-	-	-	+	+	5	C	-	+	+	-	-	-	-	-	
6	B	+	+	-	-	+	+	+	6	B	-	-	-	-	-	-	+	+	6	V	+	+	+	+	-	-	-	-	
7	N	-	-	-	-	-	-	-	7	B	-	+	+	+	-	-	+	+	7	B	+	+	-	-	-	+	+	-	
8	B	-	+	+	-	+	+	-	8	B	+	+	+	-	+	+	+	+	8	B	+	+	-	-	-	-	+	-	
9	B	+	+	+	-	-	+	+	9	B	+	+	+	-	-	+	+	+	9	B	-	-	+	+	-	-	+	-	
10	B	+	+	+	-	+	+	+	10	B	+	+	+	+	+	+	+	+	10	V	+	+	+	-	-	-	+	-	
11	V	+	+	+	-	-	+	-	11	B	-	-	-	-	+	+	+	+	11	V	-	-	+	-	-	-	+	-	
12	V	+	+	+	-	-	+	-	12	B	+	+	-	-	+	+	+	+	12	B	-	-	+	+	-	-	+	-	
13	V	+	+	-	+	-	+	+	13	B	+	+	+	+	+	+	+	+	13	V	-	-	+	+	+	+	+	+	
14	B	+	+	+	+	-	+	+	14	N	-	-	-	-	-	-	-	-	14	V	+	+	+	+	+	+	+	+	
15	B	+	+	+	-	+	+	+	15	B	+	+	+	+	+	+	+	+	15	B	-	-	-	-	-	+	+	-	
16	B	+	+	+	-	+	+	+	16	B	-	-	+	+	+	+	+	+	16	B	-	-	-	-	-	-	+	-	
17	V	+	+	-	+	+	+	+	17	B	-	-	-	+	+	+	+	+	17	B	+	+	+	-	-	-	-	-	
18	B	-	-	-	+	+	+	+	18	V	+	+	+	+	-	+	+	+	18	C	-	-	+	-	-	-	+	-	
19	C	-	-	-	-	+	+	+	19	B	+	+	+	+	-	-	+	+	19	B	-	-	-	-	-	-	+	-	
20	B	+	+	-	+	+	+	+	20	B	-	-	-	-	-	+	+	+	20	B	+	+	-	-	+	+	+	+	
21	B	-	-	-	+	+	+	+	21	V	+	+	+	+	+	+	+	+	21	B	+	+	-	-	-	-	+	+	
22	B	-	-	-	+	+	+	+	22	B	+	+	+	+	+	+	+	+	22	B	+	+	-	-	-	-	+	+	
23	B	+	+	+	-	-	+	+	23	B	-	+	+	+	+	+	+	+	23	V	+	+	+	-	-	-	+	+	
24	B	+	+	+	-	+	+	+	24	B	+	+	+	+	+	+	+	+	24	B	+	+	+	+	-	-	+	+	
25	B	-	-	+	+	+	+	+	25	B	+	+	+	+	+	+	+	+	25	V	+	+	+	+	-	-	+	+	

Tabela 11.

NOME: Dp II/UT184 (125 colônias) tratado em MSo e haploizado em MC + pFA DATA: 30/10/2002

IDENTIFICAÇÃO: Dp II-1 x UT184 (125 colônias - 5 placas)

Legenda: _ menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _ maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

Dp II- UT184	ribo	+	paba	+	bio	+	w	+	met	+	pyro	+	lac	+	tio	+	gal	+	nic	+	ac	+	chia (94)
+	124		0	124	2	122	31	93	124	0	124	0	123	1	124	0	123	1	124	0	124	0	92
ribo	1		1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
+			124		2	122	31	93	124	0	124	0	123	1	124	0	123	1	124	0	124	0	92
paba			1		1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
+					1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
bio			1.6%		3	122	31	91	122	0	122	0	121	1	122	0	121	1	122	0	122	0	90
+							0	3	2	1	2	1	2	1	3	0	3	0	2	1	2	1	3
w			25.6%		27.2%		31	94	93	1	93	1	92	2	94	0	94	0	93	1	93	1	93
met									1		0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
+			100.0%		98.4%		74.4%		124		124	0	123	1	124	0	123	1	124	0	124	0	92
pyro											1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
+			100.0%		98.4%		74.4%		0.0%		124		123	1	124	0	123	1	124	0	124	0	92
lac													2	2	2	0	2	0	1	1	1	1	2
+			99.2%		97.6%		73.6%		0.8%		0.8%		123		123	0	122	1	123	0	123	0	91
tio															0		0	0	0	0	0	0	0
+			99.2%		97.6%		75.2%		0.8%		0.8%		1.6%		125		124	1	124	1	124	1	93
gal																	1		1	0	1	0	0
+			98.4%		96.8%		76.0%		1.6%		1.6%		2.4%		0.8%		124		123	1	123	1	93
nic																			1	0	1	0	1
+			100.0%		98.4%		74.4%		0.0%		0.0%		0.8%		0.8%		1.6%		124		124	0	92
ac																					1	1	0
+			100.0%		98.4%		74.4%		0.0%		0.0%		0.8%		0.8%		1.6%		0.0%		124		92
chia																							31
+			97.9%		95.7%		98.9%		2.1%		2.1%		3.2%		1.1%		1.1%		2.1%		2.1%		93

Tabela 11.

NOME: Dp II-I//UT184 (125 colônias) tratado em MSo e haploidizado em MC + pFA DATA: 30/10/2002

IDENTIFICAÇÃO: Dp II-I x UT184 (125 colônias - 5 placas)

Placa 1										Placa 2										Placa 3									
1	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	V	+	+	+	+	+	+	+
2	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	B	+	+	+	+	+	+	+
3	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3	B	+	+	+	+	+	+	+
4	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	V	+	+	+	+	+	+	+
5	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	V	+	+	+	+	+	+	+
6	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	V	+	+	+	+	+	+	+
7	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	V	+	+	+	+	+	+	+
8	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	V	+	+	+	+	+	+	+
9	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	V	+	+	+	+	+	+	+
10	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	V	+	+	+	+	+	+	+
11	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	V	+	+	+	+	+	+	+
12	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	V	+	+	+	+	+	+	+
13	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	V	+	+	+	+	+	+	+
14	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	V	+	+	+	+	+	+	+
15	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	V	+	+	+	+	+	+	+
16	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	V	+	+	+	+	+	+	+
17	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	B	+	+	+	+	+	+	+
18	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18	V	+	+	+	+	+	+	+
19	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	B	+	+	+	+	+	+	+
20	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20	B	+	+	+	+	+	+	+
21	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21	B	+	+	+	+	+	+	+
22	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22	V	+	+	+	+	+	+	+
23	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	B	+	+	+	+	+	+	+
24	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24	V	+	+	+	+	+	+	+
25	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	V	+	+	+	+	+	+	+

NOME: Tabela 13 - Dipeptídeo Recombinante Dp(II-I)/UT184 em MSOT e Haploidoizado em MC + pFA DATA: 31/10/2002
IDENTIFICAÇÃO: Dp(II-I) x UT184 (125 colonias - 5 placas)

Legenda: _ menor que 3 desvios padrão (probabilidade > 99,7%) _ maior que 3 desvios padrão (probabilidade < 0,3%)

Dp(II- UT184	ribo	+	paba	+	bio	+	w	+	+	met	+	pyro	+	lac	+	tio	+	gal	+	nic	+	ac	+	cha (124)
+	124	1	123	1	123	1	123	124	0	122	2	123	1	108	16	116	8	123	1	118	5			
ribo	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0			
+	1.6%	124	1	123	1	123	123	1	122	2	123	1	108	16	116	8	123	1	118	5				
paba	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0			
+	1.6%	1.6%	124	1	123	123	1	122	2	123	1	124	0	108	16	116	8	123	1	118	5			
bio	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0			
+	1.6%	1.6%	1.6%	124	1	123	123	1	122	2	123	1	107	17	116	8	123	1	119	5				
w	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0			
met	100.0%	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0			
+	97.6%	97.6%	97.6%	97.6%	97.6%	2.4%	2	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0			
pyro	+	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%	1.6%	2.4%	2.4%	124	1.6%	124	123	1	108	16	116	8	123	1	118	5			
lac	+	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%	1.6%	2.4%	2.4%	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0			
+	98.4%	98.4%	98.4%	100.0%	98.4%	1.6%	2.4%	2.4%	124	1.6%	124	123	1	108	16	116	8	123	1	118	5			
tio	+	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%	1.6%	2.4%	2.4%	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0			
gal	+	87.2%	87.2%	87.2%	85.6%	12.8%	15.2%	12.8%	12.8%	12.8%	12.8%	12.8%	12.8%	108	16	116	8	123	1	118	5			
nic	+	92.8%	92.8%	92.8%	92.8%	7.2%	8.0%	7.2%	7.2%	7.2%	7.2%	7.2%	7.2%	17	0	17	0	17	0	17	0			
ac	+	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%	1.6%	2.4%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%	100	8	100	8	107	1	102	5			
cha	+	95.2%	95.2%	95.2%	96.0%	4.8%	4.0%	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%	8	0	8	0	8	0	8	0			
														117	8	117	8	116	1	111	5			
														124	8	124	8	124	8	118	5			
														10.5%	10.5%	10.5%	10.5%	10.5%	10.5%	10.5%	10.5%			
														17.7%	17.7%	17.7%	17.7%	17.7%	17.7%	17.7%	17.7%			
														4.8%	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%			
														1	1	1	1	1	1	1	1			
														118	118	118	118	118	118	118	118			
														5	5	5	5	5	5	5	5			

Tabela 15. Resultados brutos de Cluster Analysis (Jaccard's Coefficient)

UT448//UT184 e derivados 2n^R

CLUSTER ANALYSIS

Analysis begun: quinta-feira, 27 de janeiro de 2005 15:46:49

Analysing 50 variables x 11 cases

UPGMA

Jaccard's Coefficient

Node	Objects		Simil.	in group
	Group 1	Group 2		
1	MSoT2	MSoTBen1	0,769	2
2	MSo2	MSoBen1	0,654	2
3	Node 1	MSoTBen2	0,554	3
4	UT448//UT184MM	MSo1	0,550	2
5	Node 4	Node 3	0,503	5
6	UT448//UT184MBen	Node 2	0,482	3
7	UT448//UT184MC	MSoT1	0,481	2
8	Node 6	MSoBen2	0,382	4
9	Node 7	Node 5	0,360	7
10	Node 9	Node 8	0,308	11

Tabela 16. Resultados brutos de Cluster Analysis (Simple matching coefficient)

UT448//UT184 e derivados 2n^R

CLUSTER ANALYSIS

Analysis begun: quinta-feira, 27 de janeiro de 2005 15:54:20

Analysing 50 variables x 11 cases

UPGMA

Simple Matching Coefficient

Node group	Objects		Simil.	in
	Group 1	Group 2		
1	MSo2	MSoBen1	0,820	2
2	MSoT2	MSoTBen1	0,820	2
3	UT448//UT184MC	MSoT1	0,720	2
4	UT448//UT184MBen	MSoBen2	0,720	2
5	Node 2	MSoTBen2	0,670	3
6	Node 4	Node 1	0,660	4
7	UT448//UT184MM	Mso1	0,640	2
8	Node 7	Node 5	0,593	5
9	Node 3	Node 8	0,524	7
10	Node 9	Node 6	0,492	11

Tabela 17. Resultados brutos de Cluster Analysis (Jaccard's coefficient) Dp (II-I//UT184 e derivados 2n^R

CLUSTER ANALYSIS
Analysis begun: quinta-feira, 27 de janeiro de 2005 15:58:39
Analysing 33 variables x 11 cases

UPGMA
Jaccard's Coefficient

Node group		Objects		Simil.	in
		Group 1	Group 2		
1		MSoTBen1	MSoTBen2	0,846	2
2		MSoBen1	MSoBen2	0,818	2
3		MSo2	Node 2	0,769	3
4		DpII-I//UT184MC	Node 1	0,706	3
5		MSo1	Node 3	0,652	4
6		Node 4	DpII-I//UT184MM	0,609	4
7		MSoT1	MSoT2	0,583	2
8		Node 6	Node 7	0,514	6
9		DpII-I//UT184MBen	Node 5	0,411	5
10		Node 8	Node 9	0,332	11

Tabela 18. Resultados brutos de Cluster Analysis (Simple Matching Coefficient) UT448//UT184 e derivados

CLUSTER ANALYSIS
Analysis begun: quinta-feira, 27 de janeiro de 2005 16:00:11
Analysing 33 variables x 11 cases

UPGMA
Simple Matching Coefficient

Node		Objects		Simil.	in group
		Group 1	Group 2		
1		MSoBen1	MSoBen2	0,939	2
2		MSo2	Node 1	0,909	3
3		MSoTBen1	MSoTBen2	0,879	2
4		MSo1	Node 2	0,828	4
5		DpII-I//UT184MC	Node 3	0,727	3
6		DpII-I//UT184MBen	Node 4	0,720	5
7		MSoT1	MSoT2	0,697	2
8		Node 5	DpII-I//UT184MM	0,687	4
9		Node 8	Node 7	0,591	6
10		Node 9	Node 6	0,486	11

NOME: Tabela 19. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 X UT196 Controle
DATA: 2001
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 (498 colonias - 20 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- acrR met+

Placa 1				Placa 2				Placa 3							
rib pab bio acr met				rib pab bio acr met				rib pab bio acr met							
1	A	+	+	+	+	S	.	1	A	.	+	+	+	S	.
2	A	+	+	+	+	S	.	2	A	.	+	+	+	S	.
3	A	+	+	+	+	S	.	3	A	.	+	+	+	S	.
4	A	+	+	+	+	S	.	4	A	.	+	+	+	S	.
5	A	+	+	+	+	S	.	5	A	.	+	+	+	S	.
6	A	+	+	+	+	S	.	6	A	.	+	+	+	S	.
7	A	+	+	+	+	S	.	7	A	.	+	+	+	S	.
8	A	+	+	+	+	S	.	8	A	.	+	+	+	S	.
9	A	+	+	+	+	S	.	9	A	.	+	+	+	S	.
10	A	+	+	+	+	S	.	10	A	.	+	+	+	S	.
11	A	+	+	+	+	S	.	11	A	.	+	+	+	S	.
12	A	+	+	+	+	S	.	12	A	.	+	+	+	S	.
13	A	+	+	+	+	S	.	13	A	.	+	+	+	S	.
14	A	+	+	+	+	S	.	14	A	.	+	+	+	S	.
15	A	+	+	+	+	S	.	15	A	.	+	+	+	S	.
16	A	+	+	+	+	S	.	16	A	.	+	+	+	S	.
17	A	+	+	+	+	S	.	17	A	.	+	+	+	S	.
18	A	+	+	+	+	S	.	18	A	.	+	+	+	S	.
19	A	+	+	+	+	S	.	19	A	.	+	+	+	S	.
20	A	+	+	+	+	S	.	20	A	.	+	+	+	S	.
21	A	+	+	+	+	S	.	21	A	.	+	+	+	S	.
22	A	+	+	+	+	S	.	22	A	.	+	+	+	S	.
23	A	+	+	+	+	S	.	23	A	.	+	+	+	S	.
24	A	+	+	+	+	S	.	24	A	.	+	+	+	S	.
25	A	+	+	+	+	S	.	25	A	.	+	+	+	S	.

NOME: Tabela 19. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 X UT196 Controle
DATA: 2001
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 (498 colonias - 20 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- acrR met+

Placa 4				Placa 5				Placa 6			
rib pab bio acr met				rib pab bio acr met				rib pab bio acr met			
1	A	+	+	A	+	+	+	1	V	+	+
2	A	+	+	2	A	+	+	2	V	+	+
3	A	+	+	3	A	+	+	3	V	+	+
4	A	+	+	4	A	+	+	4	V	+	+
5	A	+	+	5	A	+	+	5	V	+	+
6	A	+	+	6	A	+	+	6	V	+	+
7	A	+	+	7	A	+	+	7	V	+	+
8	A	+	+	8	A	+	+	8	V	+	+
9	A	+	+	9	A	+	+	9	V	+	+
10	A	+	+	10	A	+	+	10	V	+	+
11	A	+	+	11	A	+	+	11	V	+	+
12	A	+	+	12	A	+	+	12	V	+	+
13	A	+	+	13	A	+	+	13	V	+	+
14	A	+	+	14	V	+	+	14	V	+	+
15	A	+	+	15	V	+	+	15	V	+	+
16	A	+	+	16	V	+	+	16	V	+	+
17	A	+	+	17	V	+	+	17	V	+	+
18	A	+	+	18	V	+	+	18	V	+	+
19	A	+	+	19	V	+	+	19	V	+	+
20	A	+	+	20	V	+	+	20	V	+	+
21	A	+	+	21	V	+	+	21	V	+	+
22	A	+	+	22	V	+	+	22	V	+	+
23	A	+	+	23	V	+	+	23	V	+	+
24	A	+	+	24	V	+	+	24	V	+	+
25	A	+	+	25	V	+	+	25	V	+	+

NOME: Tabela 19. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 X UT196 Controle
DATA: 2001
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 (498 colonias - 20 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- acrR met+

Placa 7				Placa 8				Placa 9			
	rib	pab	bio	acr	met		rib	pab	bio	acr	met
1	V	+	.	.	R	1	V	.	.	.	S
2	V	+	.	.	R	2	V	.	.	.	S
3	V	+	.	.	R	3	V	.	.	.	S
4	V	+	.	.	R	4	V	.	.	.	S
5	V	+	.	.	R	5	V	.	.	.	S
6	V	+	.	.	R	6	V	.	.	.	S
7	V	+	.	.	R	7	V	.	.	.	S
8	V	+	.	.	R	8	V	.	.	.	S
9	V	+	.	.	R	9	V	.	.	.	S
10	V	+	+	.	S	10	V	.	.	.	S
11	V	+	+	.	S	11	V	.	.	.	S
12	V	+	+	.	S	12	V	.	.	.	S
13	V	+	+	.	S	13	V	.	.	.	S
14	V	+	+	.	S	14	V	.	.	.	S
15	V	+	+	.	S	15	V	.	.	.	S
16	V	+	+	.	S	16	V	.	.	.	S
17	V	+	+	.	S	17	V	.	.	.	S
18	V	+	+	.	S	18	V	.	.	.	S
19	V	+	+	.	S	19	V	.	.	.	S
20	V	.	.	.	R	20	V	.	.	.	S
21	V	.	.	.	R	21	V	.	.	.	S
22	V	.	.	.	R	22	V	.	.	.	S
23	V	.	.	.	R	23	V	.	.	.	S
24	V	.	.	.	R	24	V	.	.	.	S
25	V	.	.	.	R	25	V	.	.	.	S

NOME: Tabela 19 . Análise Meiótica do Cruzamento UT448 X UT196 Controle
DATA: 2001
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 (498 colonias - 20 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- acrR met+

Placa 10				Placa 11				Placa 12			
	rib	pab	bio	acr	met		rib	pab	bio	acr	met
1	V	.	.	.	S	1	B	+	+	+	R
2	V	.	.	.	S	2	B	+	+	+	R
3	V	.	.	.	S	3	B	+	+	+	R
4	V	.	.	.	S	4	B	+	+	+	R
5	V	.	.	.	S	5	B	+	+	+	R
6	V	.	.	.	S	6	B	+	+	+	R
7	V	.	.	.	S	7	B	+	+	+	R
8	V	.	.	.	S	8	B	+	+	+	R
9	V	.	.	.	S	9	B	+	+	+	R
10	V	.	.	.	S	10	B	+	+	+	R
11	V	.	.	.	S	11	B	+	+	+	R
12	V	.	.	.	S	12	B	+	+	+	R
13	V	.	.	.	S	13	B	+	+	+	R
14	V	+	.	+	S	14	B	+	+	+	R
15	V	+	.	+	S	15	B	+	+	+	R
16	V	.	+	+	R	16	B	+	+	+	R
17	V	.	+	+	R	17	B	+	+	+	R
18	V	.	+	+	R	18	B	+	+	+	R
19	V	+	+	+	S	19	B	+	+	+	R
20	V	.	.	.	S	20	B	+	+	+	R
21	V	.	+	.	R	21	B	+	+	+	R
22	V	.	+	.	R	22	B	+	+	+	R
23	V	.	.	.	S	23	B	+	+	+	R
24	V	.	.	.	S	24	B	+	+	+	R
25	N	.	.	.	S	25	B	.	+	.	R

NOME: Tabela 19. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 X UT196 Controle
DATA: 2001
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 (498 colonias - 20 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- acrR met+

Placa 13				Placa 14				Placa 15												
rib pab bio acr met				rib pab bio acr met				rib pab bio acr met												
1	B	+	+	R	+	1	B	.	+	+	R	+	1	B	.	+	+	S	+	
2	B	+	+	R	+	2	B	.	+	+	S	+	2	B	.	+	+	S	+	
3	B	+	+	R	+	3	B	.	+	+	R	+	3	B	.	+	+	S	+	
4	B	+	+	R	+	4	B	.	+	+	R	+	4	B	.	+	+	S	+	
5	B	+	+	R	+	5	B	.	+	+	R	+	5	B	.	+	+	S	+	
6	B	+	+	R	+	6	B	.	+	+	R	+	6	B	.	+	+	S	+	
7	B	+	+	R	+	7	B	.	+	+	R	+	7	B	.	+	+	S	+	
8	B	+	.	+	R	+	8	B	.	+	+	R	+	8	B	.	+	+	S	+
9	B	+	.	+	R	+	9	B	.	+	+	R	+	9	B	.	+	+	S	+
10	B	+	.	+	R	+	10	B	.	+	+	R	+	10	B	.	.	.	R	+
11	B	.	.	+	R	+	11	B	.	+	+	R	+	11	B	.	.	.	R	+
12	B	+	.	+	R	+	12	B	.	+	+	R	+	12	B	.	.	.	R	+
13	B	+	.	+	R	+	13	B	.	+	+	R	+	13	B	.	.	.	R	+
14	B	+	.	+	R	+	14	B	.	+	+	R	+	14	B	.	.	.	R	+
15	B	+	.	+	R	+	15	B	.	+	+	R	+	15	B	.	.	.	R	+
16	B	+	.	+	R	+	16	B	.	+	+	R	+	16	B	.	.	.	R	+
17	B	+	.	+	R	+	17	B	.	+	+	R	+	17	B	.	.	.	R	+
18	B	+	.	+	R	+	18	B	.	+	+	R	+	18	B	.	.	.	R	+
19	B	+	.	+	R	+	19	B	.	+	+	R	+	19	B	.	.	.	R	+
20	B	+	.	+	R	+	20	B	.	+	+	R	+	20	B	.	.	.	R	+
21	B	+	.	+	R	+	21	B	+	+	+	S	.	21	B	.	.	.	R	+
22	B	.	+	+	R	+	22	B	.	+	+	S	+	22	B	.	.	.	R	+
23	B	.	+	+	R	+	23	B	.	+	+	S	+	23	B	.	.	.	R	+
24	B	.	+	+	R	+	24	B	.	+	+	S	+	24	B	.	.	.	R	+
25	B	.	+	+	R	+	25	B	.	+	+	S	.	25	B	.	.	.	R	+

NOME: Tabela 19. Análise Meiótica do Cruzamento UT448 X UT196 Controle
DATA: 2001
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 (498 colonias - 20 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- acrR met+

Placa 16					Placa 17					Placa 18				
	rib	pab	bio	acr met		rib	pab	bio	acr met		rib	pab	bio	acr met
1	B	.	.	R +	1	B	.	.	R +	1	B	+	.	R +
2	B	.	.	R +	2	B	.	.	R +	2	B	+	.	R +
3	B	.	.	R +	3	B	.	.	R +	3	B	+	.	R +
4	B	.	.	R +	4	B	.	.	R +	4	B	+	.	R +
5	B	.	.	R +	5	B	.	.	R +	5	B	+	.	R +
6	B	.	.	R +	6	B	.	.	R +	6	B	+	.	R +
7	B	.	.	R +	7	B	+	.	S +	7	B	+	.	R +
8	B	.	.	R +	8	B	+	.	S +	8	B	+	.	R +
9	B	.	.	R +	9	B	+	.	S +	9	B	+	.	R +
10	B	.	.	R +	10	B	+	.	S +	10	B	+	.	R +
11	B	.	.	R +	11	B	+	.	S +	11	B	+	.	R +
12	B	.	.	R +	12	B	+	.	S +	12	B	+	.	R +
13	B	.	.	R +	13	B	+	.	S +	13	B	+	.	R +
14	B	.	.	R +	14	B	+	.	S +	14	B	+	.	R +
15	B	.	.	R +	15	B	+	.	S +	15	B	+	.	R +
16	B	.	.	R +	16	B	+	.	R +	16	B	+	.	R +
17	B	.	.	R +	17	B	+	.	R +	17	B	+	.	R +
18	B	.	.	R +	18	B	+	.	R +	18	B	+	.	R +
19	B	.	.	R +	19	B	+	.	R +	19	B	+	.	R +
20	B	.	.	R +	20	B	+	.	R +	20	B	+	.	R +
21	B	.	.	R +	21	B	+	.	R +	21	B	+	.	R +
22	B	.	.	R +	22	B	+	.	R +	22	B	+	.	R +
23	B	.	.	R +	23	B	+	.	R +	23	B	+	.	R +
24	B	.	.	R +	24	B	+	.	R +	24	B	+	+	R +
25	B	.	.	S	25	B	+	.	R +	25	B	+	+	R +

NOME: Tabela 20 - Análise Meiótica do Cruzamento UT448/UT196. UT196 foi Previamente Tratado com 6-azacitidina
DATA: 25/12/2000
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 (125 colonias - 5 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- pyro+ acrR met+

Placa 1					Placa 2					Placa 3				
	rib	pab	bio	pyr	acr	met		rib	pab	bio	pyr	acr	met	
1	V	-	-	-	+	S	+	1	B	-	+	+	+	A
2	V	-	+	-	+	S	+	2	B	+	-	+	+	B
3	B	+	+	+	-	S	+	3	V	+	-	+	+	V
4	B	+	+	+	-	R	+	4	B	+	+	+	+	V
5	V	-	-	+	-	R	+	5	A	+	+	+	+	A
6	B	+	+	-	+	R	+	6	V	-	+	+	+	B
7	B	+	+	+	+	R	+	7	B	+	+	+	+	B
8	A	-	+	+	+	S	-	8	B	+	+	+	+	V
9	A	+	-	+	+	S	+	9	A	+	+	+	+	B
10	V	-	-	+	+	S	-	10	B	+	-	+	+	A
11	A	+	+	+	+	S	+	11	A	+	+	+	+	V
12	A	+	+	+	+	S	+	12	V	-	-	+	+	V
13	B	-	-	+	+	R	+	13	A	+	+	+	+	A
14	B	-	+	+	-	R	+	14	V	+	+	+	+	B
15	V	+	-	-	+	S	+	15	A	+	+	+	+	A
16	A	+	+	+	+	R	+	16	B	-	+	+	+	A
17	B	+	+	+	+	R	+	17	B	+	+	+	+	B
18	A	+	+	+	-	S	+	18	A	+	+	+	+	V
19	A	+	+	+	+	R	+	19	B	-	+	+	+	V
20	B	+	-	-	+	R	+	20	B	+	-	+	+	A
21	V	+	-	-	-	R	+	21	A	-	+	+	+	B
22	B	+	-	-	+	R	+	22	A	+	+	+	+	B
23	B	+	-	-	+	R	+	23	B	+	-	+	+	V
24	A	+	+	+	-	S	+	24	A	+	+	+	+	B
25	A	+	+	+	-	S	+	25	V	-	-	+	+	V

NOME: Tabela 20. Meiose de UT448 X UT196. UT196 foi hipometilada com mer30

DATA: 2002

IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 hipometilada com mer30 (250 colonias - 10 placas) - CONTROLE

LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- pyro+ acrR met+

Placa 4										Placa 5										Placa 6										
					rib pab bio pyr acr met										rib pab bio pyr acr met										rib pab bio pyr acr met					
1	V	+	.	.	+	.	.	+	R	+	1	V	+	+	+	+	+	+	R	+	1	B	+	+	+	+	+	+	R	+
2	A	.	+	.	.	.	.	S	+	2	B	.	.	.	.	.	.	.	R	+	2	V	+	.	+	+	+	+	S	+
3	V	.	.	.	.	.	.	S	.	3	V	+	.	.	.	.	.	.	S	.	3	B	+	.	+	+	+	+	R	+
4	A	+	+	+	+	+	+	S	.	4	B	+	.	.	.	.	.	.	R	+	4	V	.	.	+	+	+	+	R	+
5	A	+	+	+	+	+	+	S	.	5	B	+	.	.	.	.	.	.	S	+	5	A	+	.	+	+	+	+	R	+
6	B	.	.	.	.	.	.	R	+	6	A	+	+	+	+	+	+	+	S	+	6	A	+	+	+	+	+	+	S	.
7	B	+	.	.	.	.	.	R	+	7	B	+	+	+	+	+	+	+	R	+	7	B	+	+	+	+	.	.	R	+
8	B	+	.	.	.	.	.	R	+	8	B	+	+	+	+	+	+	+	R	+	8	V	+	.	+	+	.	.	S	+
9	A	+	+	+	+	+	+	R	+	9	V	.	.	.	.	.	.	.	S	+	9	A	+	.	+	+	+	+	R	+
10	V	.	.	.	.	.	.	S	+	10	B	.	.	.	.	.	.	.	R	+	10	A	+	+	+	+	+	+	S	+
11	A	.	+	+	+	+	+	S	.	11	B	.	.	.	.	.	.	.	R	+	11	V	+	+	+	+	.	.	R	+
12	B	.	.	.	.	.	.	R	+	12	V	.	.	.	.	.	.	.	S	.	12	B	.	.	.	.	+	+	R	.
13	B	+	+	+	+	+	+	R	+	13	A	+	.	.	.	.	.	.	R	.	13	A	.	.	.	.	+	+	R	+
14	B	+	+	+	+	+	+	R	+	14	V	+	.	.	.	.	.	.	S	+	14	V	.	.	.	.	+	+	R	+
15	A	.	+	+	+	+	+	R	+	15	A	+	+	+	+	+	+	+	R	+	15	B	+	.	+	+	+	+	S	.
16	B	.	.	.	.	.	.	R	+	16	B	+	.	.	.	.	.	.	S	+	16	B	+	+	+	+	+	+	S	+
17	B	.	.	.	.	.	.	R	+	17	A	+	+	+	+	+	+	+	R	.	17	V	+	.	.	.	.	.	R	.
18	B	.	.	.	.	.	.	R	+	18	B	+	+	+	+	+	+	+	R	+	18	A	+	+	+	+	.	.	S	+
19	V	+	+	+	+	+	+	R	+	19	B	.	.	.	.	.	.	.	R	+	19	V	+	.	.	.	.	.	S	.
20	V	.	.	.	.	.	.	R	+	20	B	.	.	.	.	.	.	.	R	+	20	B	.	.	.	.	.	+	R	+
21	A	+	+	+	+	+	+	R	+	21	V	.	.	.	.	.	.	.	S	.	21	A	.	.	.	.	+	+	S	+
22	B	+	.	.	.	.	.	R	+	22	V	.	.	.	.	.	.	.	S	.	22	A	.	.	.	.	+	+	S	+
23	B	.	.	.	.	.	.	R	+	23	A	+	+	+	+	+	+	+	R	+	23	V	.	.	.	.	+	+	R	+
24	A	.	.	.	.	.	.	S	.	24	V	+	+	+	+	+	+	+	R	+	24	B	.	.	.	.	.	.	S	.
25	B	.	.	.	.	.	.	R	+	25	B	+	+	+	+	+	+	+	R	+	25	B	.	.	.	.	+	+	R	.

NOME: Tabela 21. Meiose de UT448 X UT196. UT196 foi hipometilada com mer30
DATA: 2002
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 hipometilada com mer30 (250 colonias - 10 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- pyro+ acrR met+

Placa 1										Placa 2										Placa 3										
rib pab bio pyr acr met										rib pab bio pyr acr met										rib pab bio pyr acr met										
1	V	.	.	.	.	.	.	S	+	1	V	+	.	+	.	.	R	.	.	.	1	B	+	+	+	.	.	S	+	+
2	B	+	+	+	+	+	+	R	+	2	A	.	+	+	.	.	S	.	.	.	2	V	.	.	+	.	.	S	+	+
3	A	+	+	+	+	+	+	S	+	3	B	+	.	+	.	.	R	+	.	.	3	B	+	.	+	+	+	S	+	+
4	B	+	.	+	+	+	+	R	+	4	A	+	+	+	+	+	R	+	.	.	4	A	+	.	+	+	+	R	+	+
5	A	.	+	+	+	.	.	S	+	5	A	.	+	+	+	+	S	.	.	.	5	B	+	.	+	.	.	R	+	+
6	V	+	+	+	+	.	.	S	+	6	B	.	.	+	+	.	R	.	.	.	6	A	+	.	+	+	+	R	+	+
7	A	.	+	+	+	.	.	S	+	7	B	.	+	+	+	.	S	+	.	.	7	B	.	+	+	+	.	R	.	.
8	A	+	+	+	+	+	+	R	+	8	B	+	.	+	+	+	S	+	.	.	8	V	.	.	+	.	.	R	+	+
9	A	+	+	+	+	.	.	S	+	9	B	+	.	+	+	+	R	.	.	.	9	A	+	.	+	.	.	R	+	+
10	B	+	+	+	+	+	+	R	+	10	V	.	+	+	+	+	S	.	.	.	10	B	+	+	+	+	+	S	+	+
11	A	.	+	+	+	+	+	S	+	11	A	+	+	+	.	.	R	+	.	.	11	B	+	+	+	+	.	S	+	+
12	A	+	+	+	+	.	.	S	+	12	V	+	.	+	+	.	S	.	.	.	12	B	+	.	+	+	.	R	+	+
13	B	+	.	+	+	.	.	R	+	13	V	+	.	+	+	+	R	.	.	.	13	A	.	+	+	+	.	S	.	.
14	A	+	.	+	+	.	.	R	+	14	B	+	+	+	+	+	R	+	.	.	14	B	+	+	+	+	.	R	+	+
15	B	+	.	+	+	.	.	R	+	15	V	.	.	+	+	.	R	.	.	.	15	A	+	+	+	+	.	R	+	+
16	B	+	+	+	+	+	+	R	+	16	B	+	+	+	+	+	R	+	.	.	16	A	+	+	+	+	.	R	+	+
17	A	+	+	+	+	+	+	R	+	17	B	.	+	+	+	+	R	+	.	.	17	B	+	+	+	+	+	R	+	+
18	V	.	.	+	+	+	+	S	+	18	B	+	.	+	+	+	S	.	.	.	18	B	+	+	+	+	.	R	+	+
19	V	.	.	.	+	+	+	S	.	19	B	+	+	+	+	.	R	+	.	.	19	B	.	.	+	+	+	S	+	+
20	B	.	.	+	+	.	.	R	+	20	A	.	+	+	+	.	S	.	.	.	20	A	+	+	+	+	+	R	+	+
21	B	+	+	+	+	.	.	R	+	21	A	+	+	+	+	+	S	.	.	.	21	B	.	.	+	+	.	S	+	+
22	V	.	.	+	+	.	.	S	+	22	B	+	+	+	+	+	R	.	.	.	22	V	.	.	+	+	+	R	.	.
23	B	+	.	+	+	+	+	R	+	23	B	+	+	+	+	+	R	+	.	.	23	B	.	.	+	+	.	S	.	.
24	A	+	+	+	+	+	+	S	+	24	B	+	+	+	+	.	R	+	.	.	24	A	.	.	+	+	.	R	.	.
25	A	+	+	.	+	.	.	S	+	25	B	+	+	+	.	.	R	.	.	.	25	V	.	.	+	+	.	S	.	.

NOME: Tabela 20. Meiose de UT448 X UT196. UT196 foi hipometilada com mer30

DATA: 2002

IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 hipometilada com mer30 (250 colonias - 10 placas) - CONTROLE

LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- pyro+ acrR met+

Placa 4		rib pab bio pyr acr met				
1	V	+	.	+	R	+
2	A	.	+	.	S	+
3	V	.	.	.	S	.
4	A	+	+	+	S	.
5	A	+	+	+	S	.
6	B	.	.	.	R	+
7	B	+	.	.	R	+
8	B	+	.	.	R	+
9	A	+	+	+	R	+
10	V	.	.	.	S	+
11	A	.	+	.	S	.
12	B	.	.	+	R	+
13	B	+	+	+	R	+
14	B	+	+	+	R	+
15	A	.	+	.	R	+
16	B	.	.	+	R	+
17	B	.	.	+	R	+
18	B	.	.	+	R	+
19	V	+	+	+	R	+
20	V	.	.	+	R	+
21	A	+	+	+	R	+
22	A	+	.	+	R	+
23	B	.	.	+	R	+
24	A	.	.	.	S	.
25	B	.	.	+	R	+

Placa 5		rib pab bio pyr acr met				
1	V	+	+	+	R	+
2	B	+	.	+	R	+
3	V	+	.	.	S	.
4	B	+	.	.	R	+
5	B	+	.	+	S	+
6	A	+	+	+	S	+
7	B	+	+	+	R	+
8	B	+	+	+	R	+
9	V	.	.	+	S	+
10	B	.	.	+	R	+
11	B	.	+	.	R	+
12	V	.	.	.	S	.
13	A	+	.	+	R	.
14	V	+	.	.	S	+
15	A	+	+	.	R	+
16	B	+	.	+	S	+
17	A	+	+	.	R	.
18	B	+	+	+	R	+
19	B	.	.	+	R	+
20	B	.	+	+	R	+
21	V	.	+	+	R	+
22	V	.	.	.	S	.
23	A	+	+	+	R	+
24	V	+	+	+	R	+
25	B	+	+	+	R	+

Placa 6		rib pab bio pyr acr met				
1	B	+	+	+	R	+
2	V	+	.	+	S	+
3	B	+	.	+	R	+
4	V	.	.	+	R	+
5	A	+	.	+	R	+
6	A	+	+	+	S	.
7	B	+	+	+	R	+
8	V	+	.	+	S	+
9	A	+	.	+	R	+
10	A	+	+	+	S	+
11	V	+	+	+	R	+
12	B	.	.	.	R	.
13	A	.	.	+	R	+
14	V	.	.	.	R	+
15	B	+	.	+	S	.
16	B	+	+	+	S	+
17	V	+	.	.	R	.
18	A	+	+	+	S	+
19	V	+	.	.	S	.
20	B	.	.	.	R	+
21	A	.	.	+	S	+
22	A	.	+	+	S	+
23	V	.	.	+	R	+
24	B	.	.	.	S	.
25	B	.	+	.	R	.

NOME: Tabela 20. Meiose de UT448 X UT196. UT196 foi hipometilada com mer30
DATA: 2002
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 hipometilada com mer30 (250 colonias - 10 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- pyro+ acrR met+

Placa 7										Placa 8										Placa 9									
rib pab bio pyr acr met										rib pab bio pyr acr met										rib pab bio pyr acr met									
1	B	+	+	+	+	+	R	+	+	1	A	.	+	+	+	R	+	+	+	1	A	.	+	+	+	S	.	+	+
2	B	.	.	.	.	.	R	+	+	2	B	+	.	.	.	R	+	+	+	2	B	+	.	.	.	+	R	+	+
3	A	.	.	.	.	.	R	+	+	3	B	+	.	.	.	R	+	+	+	3	V	+	.	.	.	+	R	+	+
4	A	+	+	+	+	+	R	+	+	4	B	+	+	+	+	R	+	+	+	4	A	+	+	+	+	+	R	+	+
5	B	+	+	+	+	+	R	+	+	5	V	+	+	+	.	R	+	+	+	5	B	+	.	.	.	+	R	+	+
6	A	+	.	+	+	+	R	+	+	6	A	.	+	+	.	S	.	+	+	6	A	+	+	+	+	+	R	+	+
7	B	.	.	.	.	.	R	+	+	7	A	.	+	+	+	R	+	+	+	7	B	.	.	.	+	+	R	+	+
8	B	+	+	+	+	.	R	+	+	8	A	+	+	+	+	R	+	+	+	8	B	+	.	.	+	+	R	+	+
9	B	+	+	+	+	+	R	+	+	9	B	+	+	+	.	S	+	+	+	9	B	+	.	.	+	+	R	+	+
10	V	.	.	.	.	.	S	.	+	10	B	.	.	.	.	R	+	+	+	10	B	.	+	+	+	.	R	+	+
11	A	.	+	.	.	.	S	.	+	11	A	+	+	+	+	R	+	+	+	11	B	+	.	.	+	+	R	+	+
12	B	.	.	.	.	.	R	+	+	12	B	+	.	.	.	R	+	+	+	12	B	+	.	.	+	+	R	+	+
13	A	+	+	+	+	+	S	.	+	13	B	+	+	+	+	R	+	+	+	13	V	+	.	.	+	+	S	+	+
14	B	.	+	+	+	+	R	+	+	14	V	+	+	+	+	S	+	+	+	14	B	.	.	.	+	+	R	+	+
15	B	.	+	+	+	+	R	+	+	15	B	+	+	+	+	R	+	+	+	15	B	+	+	+	+	+	R	+	+
16	A	+	+	+	+	+	S	+	+	16	B	.	.	.	.	R	+	+	+	16	B	.	.	.	+	+	R	+	+
17	V	+	.	+	+	+	S	+	+	17	B	+	.	.	.	R	+	+	+	17	B	+	+	+	+	+	R	+	+
18	B	.	+	+	+	+	R	+	+	18	V	+	+	+	.	R	+	+	+	18	B	.	.	+	+	+	R	+	+
19	V	+	.	+	+	+	R	+	+	19	B	+	+	+	+	R	+	+	+	19	B	.	+	+	+	+	R	+	+
20	B	.	+	+	+	+	R	+	+	20	B	.	.	.	.	R	+	+	+	20	B	.	.	.	+	+	R	+	+
21	V	+	+	.	+	+	S	.	+	21	B	.	.	.	.	R	+	+	+	21	B	+	.	.	+	.	R	+	+
22	B	.	.	.	.	.	R	+	+	22	B	+	+	+	.	R	+	+	+	22	A	+	+	+	+	+	R	+	+
23	B	+	+	+	+	+	R	+	+	23	B	.	.	.	.	R	+	+	+	23	B	+	+	+	+	+	S	+	+
24	A	.	.	.	.	.	S	+	+	24	B	+	+	+	.	R	.	+	+	24	V	+	+	+	+	.	R	+	+
25	A	.	+	+	+	+	S	.	+	25	B	.	.	.	+	R	.	+	+	25	B	.	.	.	+	.	R	+	+

NOME: Tabela 20. Meiose de UT448 X UT196. UT196 foi hipometilada com mer30
DATA: 2002
IDENTIFICAÇÃO: UT448 x UT196 hipometilada com mer30 (250 colonias - 10 placas) - CONTROLE
LINHAGEM: w- y+ ribo- paba- bio- pyro+ acrR met+

Placa 10		rib pab bio pyr acr met				
1	B	.	.	+	.	R +
2	A	.	.	+	+	R +
3	B	+	.	+	.	R +
4	A	+	+	+	+	R +
5	B	+	.	+	+	R +
6	B	.	.	.	+	R +
7	V	+	+	+	.	R +
8	A	.	+	+	.	R +
9	B	+	.	.	+	R +
10	B	.	+	+	+	R +
11	A	+	+	+	+	R +
12	B	.	.	.	+	R +
13	V	.	.	.	+	R +
14	B	+	.	+	+	R +
15	A	+	.	+	+	R +
16	A	+	.	.	.	R +
17	V	+	+	.	+	R +
18	V	+	.	.	+	R +
19	A	+	.	+	.	R +
20	B	+	.	.	+	R +
21	V	.	.	.	.	S +
22	A	.	+	+	+	S +
23	B	.	.	.	+	R +
24	B	+	+	+	+	R +
25	V	+	.	+	+	S +

Tabela 22

LABORATÓRIO NON-GMO LABORATORY NON-GMO		LAUDO DE ANÁLISE ANALYSIS REPORT	
IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA Nº 01314 SAMPLE IDENTIFICATION GRÃOS DE SOJA COZIDOS E TRITURADOS CONVENCIONAL * ICB-USP * OBJETIVO: PESQUISA * O MATERIAL FOI MANTIDO EM CONGELADOR E ENVIADO CONGELADO			
CLIENTE CLIENT	RECEBIDO DE RECEIVED FROM	PESO DA AMOSTRA SAMPLE WEIGHT	
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMEDICAS _ UNIVE	ICB_USP em 16/05/05 15:10:17	+ OU - 0020g*	
* Peso da amostra não conforme os limites recomendados (documentos CEN/T 275/WG 11). Sample size no according to recommended limits (documents CEN/T 275/WG 11).			
RELATÓRIO NÚMERO ANALYSIS REPORT NUMBER		SANTOS, 18/05/2005	
0505918 -7101314			

ANÁLISE DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGM) POR PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS (GMO) ANALYSIS BY PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	
ANÁLISES ANALYSIS	RESULTADOS RESULTS
Detecção do evento Roudup Ready a partir de 0,01% RR event detection > 0,01%	NEGATIVO
Quantificação do evento Roudup Ready a partir de 0,1% RR quantification by PCR on real-time > 0,1%	*****

**Análises realizadas de acordo com as recomendações da CEN (documentos CEN/T 275/WG 11)

Analyses performed according to CEN guidelines (documents CEN/T 275/WG 11)

Resultados validos apenas para a amostra analisada

The results are valid only for the analysed sample

PCR para o gene específico Roundup Ready, 50 amplificações por reação

PCR for Roundup Ready gene, 50 amplifications per reaction

OBSERVAÇÃO

OBSERVATION

XX

Mariana Saldanha
Coordenadora de Laboratório

As informações declaradas neste Relatório correspondem aos resultados obtidos através dos procedimentos de inspeções ou ensaios realizados, em conformidade com as instruções recebidas de nosso Cliente e/ou baseadas em padrões técnicos, costumes, práticas comerciais, ou outras circunstâncias que, em nossa opinião profissional, deveriam ser consideradas.

Este relatório é emitido pela SGS de acordo com suas Condições Gerais de Inspeção e Testes. A emissão deste relatório não desobriga os compradores ou vendedores de exercerem todos os seus direitos, nem os exime de suas responsabilidades, de acordo com a lei e o Contrato de Venda. Estipulações em contrário não são de nossa responsabilidade. A nossa responsabilidade sobre este relatório é limitada aos casos de negligência grave devidamente comprovados pela parte que solicitou nossos serviços e em hipótese alguma a correspondente indenização poderá ser superior a dez vezes o valor recebido como remuneração pelos nossos serviços. Exceto por acordo especial, amostras quando retiradas, não serão mantidas pela Companhia por mais de três meses.

ANEXOS

A short-term test adapted to detect the genotoxic effects of environmental volatile pollutants (benzene fumes) using the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

Tiago Domingues Zucchi,^a Fernando Domingues Zucchi,^a Paola Poli,^b Itamar Soares de Melo^c and Tania M. A. D. Zucchi^{*a}

^a Department of Parasitology and Biotechnology Research Center, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900 São Paulo, Brazil. E-mail: tzucchi@uol.com.br; Fax: (055) (11) 3091-7417; Tel: (055) (11) 3091-7264

^b Dipartimento di Genetica Antropologia Evoluzione, Università di Parma, Parco Area delle Scienze 11A, 43100 Parma, Italy

^c Department of Microbiology, EMBRAPA – Meio Ambiente, Rodovia SP 340, Km 127.5, 13820-000 Jaguariúna, SP, Brazil

Received 10th January 2005, Accepted 12th April 2005

First published as an Advance Article on the web 11th May 2005

With the recent focus on environmental problems, increasing awareness of the harmful effects of industrial and agricultural pollution has created a demand for progressively more sophisticated pollutant and toxicity detection methods. Using *Aspergillus nidulans* strains this work presents a new short term-test that, most importantly, enables the rapid and inexpensive detection of volatile pollutants that induce genotoxic/carcinogenic effects in animals. The main aim is to contribute to environmental health protection, and special attention is directed to monitoring the hazard posed by benzene (as a carcinogenic agent model) mainly because its ubiquitous presence often leads to severe noxious effects in humans among whom increased rates of human leukemia have been reported. To evaluate even the submutagenic effects of benzene fumes, two *Aspergillus nidulans* diploid strains, heterozygous for several auxotrophic mutations, were used. The DNA lesions produced stimulate mitotic recombination and homozygotization of auxotrophic recessive mutations. Conidial exposure to a saturated atmosphere of benzene fumes for 20 s was enough to increase the mitotic recombination frequencies significantly. Genetic analyses of treated diploids evidenced alterations related to mitotic recombination frequencies, gene expression, and allelic segregation rates. Altogether they reflect the potential of benzene to induce alterations in the fungal DNA, and albeit indirectly, they also respond for the genotoxic/carcinogenic harmful side effects widely connected to benzene. This is the first description of a sensitive, rapid and inexpensive test able to detect the submutagenic dose effects of volatile environmental compounds. In addition, despite concentrating on benzene the same test can be applied to many other pollutants, volatile or not. Additionally, the test can also be used to detect the antigenotoxic properties of foods and drugs.

Introduction

Human health risk determination associated with benzene fumes is not easily extrapolated from *in vitro* findings. On the other hand, direct monitoring, normally used on professionally exposed workers, may not be applied to the general population. Furthermore, the international scientific community is encouraging scientists to develop alternative (non animal) tests for DNA damaging agents. Short-term tests on genetically well known microorganisms, such as *Aspergillus nidulans*, can be useful to assess the genotoxic load of environmental benzene fumes, and other volatile and non volatile pollutants, as *in vivo* models.

Many chemical and physical agents that cause DNA damage can also induce mitotic recombination.¹⁻⁴ Besides, biological agents as plasmids, linear DNA, DNA single strand, viral genomes and RNA can also interfere with the mitotic recombination frequencies.⁵⁻⁸ With the recent focus on environmental problems, increasing awareness of the harmful effects of industrial and agricultural pollution has created a demand for progressively more sophisticated pollutant and toxicity detection methods.⁹ Obviously, the first step to monitoring environmental volatile pollutants is chemical identification. However, attention and alarm thresholds only concern the toxic effects of the studied polluting substance and do not take into considera-

tion the question of chronic exposure to low doses of the noxious chemical. On the other hand, assays for biological monitoring must define cytotoxic and genotoxic risks for the environment and human health efficiently. As involved assays play a crucial role both in the prescreening of suspected carcinogens and in the evaluation of established carcinogens,¹⁰ not surprisingly, recent years have seen significant advances in the development of rapid and convenient micro-scale bioassays.¹¹ Microorganisms provide a neat solution, since they can be cultured easily and inexpensively, as their small size makes them more tolerant than cellular components to sub-optimum conditions of temperature and pH.¹² Indeed, most whole cell biosensors reported to date are based on bacterial cells. In spite of their larger population sizes, rapid growth rates, low costs and convenient maintenance,⁹ there are some disadvantages in their use. Bacterial cells may be relatively fragile in the sensor environment.¹³ Moreover, cellular responses to some molecules are different in prokaryotes and eukaryotes and this limits their application in toxicity evaluation and drug screening for higher organisms. Fungal cells, however, can eliminate all the disadvantages offered by bacterial devices and additionally, they can provide more relevant information directly applicable to other eukaryote organisms.¹³

This work presents a modification of the previous short-term test Homozygotization Index assay; or HI, (cf. Pires and

Zucchi¹⁴). Other details of Material and methods. Since then the HI assay has been efficiently used to detect the genotoxic effects of physical factors (UV, X-rays and gamma rays), biological factors (RNA) and chemicals (lithium carbonate, megalol, trifluralin and diuron).¹⁵ Modifications herein made the HI assay applicable to the detection of benzene fumes genotoxicity. The choice of this volatile compound relies on its ubiquitous environmental presence. Besides, exposition to benzene fumes may lead to hematotoxic, clastogenic and leukogenic harmful side effects in humans and animals.¹⁶ Furthermore, benzene genotoxicity has been demonstrated in several *in vivo* studies that have evaluated different endpoints such as micronuclei,¹⁷ sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations,¹⁸ and frequency of mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus.¹⁹

Towards the mentioned aims, modification of the HI assay allowing its use in the detection of the genotoxic effects of benzene fumes has proved efficient and sensitive. Moreover this is the first time that a rapid and inexpensive test to detect the genotoxic effects of an environmental volatile pollutant is described. Besides, the same assay can be used to detect the effects of many other pollutants (volatile, or not), and anti-genotoxic properties of food and drugs, as well.

Material and methods

Strains

Haploid strains. Even though used strains (UT448 and UT196) were obtained from Utrecht (Holland) their original stocks were from Glasgow (UK). Besides, a mutant (*Dp* II-I) was obtained²⁰ after treating the UT448 strain with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG). Schematic maps of the haploids strains are shown in Clutterbuck²¹ and Pires and Zucchi.⁸ The mutant loci are: **UT448-*wA2*** (II), white conidia; ***riboA1***, ***pabaA124***, ***bioA1*** (I), with requirements for riboflavin, *p*-aminobenzoic acid and biotin, respectively; ***AcrA1*** (II), resistant to acriflavine. **UT184-*chaA1*** (VIII), "chartreuse" conidia; ***pyroA4*** (IV); ***sB3*** (VI); ***nicB8*** (VII); ***riboB2*** (VIII), with requirements for pyridoxine, sodium thiosulfate, nicotinamide and riboflavin, respectively; ***galA1*** (III); ***facA303*** (V); ***lacA1*** (VI), unable to utilize galactose, acetate and lactose as the only carbon source, respectively; ***suA1*** (I); ***AcrA1*** (II), resistant to sulfanilamide and acriflavine, respectively. ***Dp* II-I:** ***wA2*** (II), white conidia; ***riboA1***, ***pabaA124***, ***bioA1*** (I), with requirements for riboflavin, *p*-aminobenzoic acid and biotin, respectively; ***AcrA1*** (II), resistant to acriflavine; ***uvr*** (II), sensitive to UV-light; ***Dp*** (II-I), duplication of a segment from chromosome II transposed to chromosome I, inserted into *paba-y* genetic interval.²³⁻²⁶

Diploid strains. The diploid strains UT448//UT184 and *Dp* II-I//UT184 were prepared following Roper's methodology.²⁷ The mutant alleles were allocated to their linkage groups by mitotic haploidization²⁸ facilitated by treatment with *p*-fluorophenylalanine (0.02 mg mL⁻¹ *p*FA).^{29,30}

Note: *A. nidulans* conidia coloration depends on pigments produced in the mature ascospore. This involves the expression of at least two genes, *yA* and *wA* (in Zucchi³¹). As produced by *yA*, the *p*-diphenoloxidase, or laccase, they transform the precursor yellow pigment into the mature green (*y*⁺) form. The *wA* gene encodes for polyketide synthase, and mutations in a *wA* result into white spored strains. Watanabe *et al.*,³² found out that the *wA* gene encodes for a polyketide synthase of heptaketide naphthopyrone YWA1. Additionally, they revisited the *wA* gene sequence and verified that its product was, indeed, the novel naphthopyrone (YWA1), instead of citreoisocumarin and its derivatives.³³⁻³⁵ This new compound (YWA1) is considered an intermediate of *A. nidulans* conidial spore pigment. In short, conidia color in colonies depends on the *w*⁺ allele

present at chromosome II. Green or yellow conidia colors depend on the presence of *y*⁺ or *y* alleles, respectively, at chromosome I. In this way, *y*⁺*w*⁺, *y*⁺*w*, *yw*⁺ and *yw* genotypes confer to the conidia green, white, yellow and white phenotypes, respectively.^{33,36,37}

Media and culture conditions

The minimum (MM) and complete media (CM) follows Van de Vate and Jansen.³⁸ CM was used to maintain stock cultures. The selective medium (SM) was made of MM supplemented according to the requirements of each strain. Solid medium contained 1.2% agar. Stock cultures were grown at 37 °C and kept at 4 °C.

Determination of benzene fume effects in conidia viability

~5 × 10² cells mL⁻¹ conidia suspensions from each of the haploid strains (UT448, UT184 and *Dp* II-I) and diploid strains (UT448//UT184 and *Dp* II-I//UT184) were prepared in saline. 1.0 mL aliquots of conidial suspensions were transferred into 5 tubes. Benzene fumes (0, 10, 30, 60 and 120 s) were injected directly into suspensions of each tube and 100 µL samples were seeded on the surface of solid CM and incubated for 24 h at 37 °C. Developed colonies were scored and the influence of conidia inhibition by benzene fumes was determined.

Selection of diploid recombinants segregating in MM, non-benzene treated (controls)

Conidia from each diploid strain (UT448//UT184 and *Dp* II-I//UT184) were inoculated on the surface of solid MM agar and incubated for 5 days at 37 °C. Developed colonies presented sectors with vigorous conidiation. The green sectors correspond to diploid strains (+/+ , +/- and -/+); the -/- recombinant diploids did not develop in MM. All them were purified in MM and stored in CM at 4 °C, for later mitotic analyses.

Selection of diploid recombinants segregating in MM after benzene treated

UT448//UT184 and *Dp* II-I//UT184 diploid conidia were inoculated on the surface of solid MM agar and immediately exposed to 20 s saturated benzene fumes: uncovered MM plates were inverted over same diameter plates containing 20 mL of pure benzene (Merk) and uncovered. Exposure times were previously determined as 20 s for the very weak induced toxicity. These exposures were performed under biosafety conditions at 38 °C. Following 7 day incubation at 37 °C, developed colonies presented sectors with vigorous conidiation. All the sectors correspond to diploid strains (+/+ , +/- and -/+), which were then purified on MM and stored in CM at 4 °C, for later mitotic analyses. The recombinant diploids -/- did not develop.

Mitotic analysis of control and/or benzene treated diploid strains

Conidia from control diploid strains, UT184//UT448 and *Dp* II-I//UT184, were individually transferred to ten CM plus haploidizant agent *p*FP (0.02 mg mL⁻¹ *p*-fluorophenylalanine) plates for haploidization. Following incubation at 37 °C, over 10 days, diploid colonies yielded several haploid sectors that were isolated and genotypically analyzed. Conidia from haploids were transferred to 25 defined positions (5 × 5 pattern) on CM plates and incubated for 48 h. After this incubation period they were replicated to the following selective media: SM (MM plus 1 µg mL⁻¹ riboflavin, 0.7 µg mL⁻¹ *p*-aminobenzoic acid, 0.02 µg mL⁻¹ biotine, 0.5 µg mL⁻¹ pyridoxine, 1 µg mL⁻¹ nicotinamide, and 1.24 mg mL⁻¹ sodium thiosulfate), SM lacking individually riboflavin, *p*-aminobenzoic acid, biotin, pyridoxine, nicotina-

Table 1 Conidia viability (colonies frequency) after benzene fumes treatments

Strain	Exposure time/s				
	Control	10	30	60	120
UT184	7.525×10^2 a	6.725×10^2 a	6.225×10^2 ab	5.450×10^2 b	5.250×10^2 b
UT448	4.850×10^2 a	2.700×10^2 b	3.375×10^2 b	1.100×10^2 c	0.600×10^2 c
<i>Dp</i> II-I	2.775×10^2 a	1.800×10^2 ab	1.925×10^2 ab	1.225×10^2 b	1.325×10^2 b
<i>Dp</i> II-I/UT184	2.250×10^2 a	1.900×10^2 a	1.350×10^2 ab	1.000×10^2 b	0.750×10^2 b
UT448/UT184	2.300×10^2 a	2.075×10^2 a	1.050×10^2 b	1.100×10^2 b	0.475×10^2 b

Note: same letter, non-significant differences by Tuckey-test at 5% ($p < 0.05$).

midic or sodium thiosulfate, for determination of the haploid segregants genotypes. The carbon sources were also determined for each haploid segregant: SM lacking glucose and substituted with lactose (10 mg mL^{-1}), galactose (10 mg mL^{-1}) or sodium acetate (12 mg mL^{-1}). The SM plates were observed after 24 and 48 h. Non-treated diploids were also haploidized for an experiment control. The colonies growing on selective media were observed after 24 and 48 h incubation. The colonial growing on selective media were observed after 24 and 48 h incubation. The genotype of each haploid segregant was recorded, mitotic recombination frequencies were determined (%) for each genetic interval and data were disposed in Latin Square format Tables to facilitate the observation of segregation of mutant and wild alleles, appearance of new mutations, gene silencing or reactivation occurrences.

The Homozygotization Index (HI) test (Pires and Zucchi¹⁴)

Mitotic crossing-over promotes homozygotization of genes present in heterozygous condition in diploids and, if the treatment induces mitotic crossing-over in the heterozygous diploids, +/+ and -/- diploids are formed irrespective of each marker. Since the treatment is applied in MM, only heterozygous (+/- and -/+) or homozygous (+/+) diploids can develop. After haploidization when no mitotic crossing-over occurs, the ratio of haploid segregants is 4(+) : 4(-). As described above, because of the selection against recessive homozygous classes after recombinational event between any marker and centromere, HI, (i.e. the ratio between percentages of + and - segregant colonies) is 2.0, instead of expected 1.0. Therefore an HI value higher than 2.0 will indicate the occurrence of more than one mitotic crossing-over event for the given marker. Conversely an HI value lower than 2.0 will indicate either the absence of crossing-over for the marker, or that it was not selected on MM, e.g., markers for conidia color.

Thus, any treatment that promotes DNA alterations in the DNA methylation pattern, affects recombinational events and increases the mitotic recombination frequencies, as expected. So, in the present context the HI is an indirect way to evaluate the frequency of non-repaired recombinogenic alterations in diploid genomes induced by benzene and, consequently, a byproduct of the benzene genotoxic effect.

Following a method recently devised for *A. nidulans* genetic analyses, with Delphi 4 (PLACAS, Copyright 2000 cbonato), the results from genetic mitotic analyses were presented in Latin Square Tables Format. HI results were analyzed by a modification of the χ^2 test known as a contingency table with 1% significance.

Results and discussion

Conidia viability after benzene fumes exposure

After exposure to benzene fumes, each haploid original strain was tested for its viability to develop colonies. *Dp* II-I and UT448 showed significant decreases in conidia viability after 10 s of benzene fumes exposure (Table 1). Concerning viability curves (Fig. 1A) both strains showed similar profiles. Considering that

the *Dp* II-I strain is a mutant obtained from MNNG treatment of the UT448 strain (see Materials and methods) this was expected.

After benzene exposure, the conidia viability of the UT184 strain remained high. So, among the tested strains this strain has been considered as the most resistant to benzene fumes. Conversely, under similar procedures and criteria, the UT448 strain can be assigned as the most susceptible, and the *Dp* II-I strain as tolerant. Besides, when the diploid *Dp* II-I/UT184 was tested against benzene fumes, the curve profile was very similar to that of the haploid *Dp* II-I (Fig. 1B). The same results were observed with the diploid UT448/UT184, whilst the curve was similar to that of the UT448 strain (Fig. 1C).

In this way, UT184 bears the recessive allele for relative resistance to benzene fumes and UT448 bears the dominant allele for sensitivity. In another assay we had chosen another methodology using 20 s saturated benzene fumes exposure. With this methodology no decrease was observed in the conidia viability (data not shown), but the system was able to detect differences in mitotic recombination frequencies, as will be explained below.

Fig. 1 Inhibition of conidia viability by benzene fumes. (A) behavior of haploids strains; (B and C) illustrate diploid strains (*Dp* II-I/UT184 and UT448/UT184) curve feature versus its haploids.

Table 2 Increased "Homozygotization Index" of several markers from UT448//UT184 (A) and *Dp* II-I//UT184 (B) exposed to benzene fumes

A										
Linkage group	I	I	I	II	IV	VI	III	VII	VIII	
Markers	<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>w</i>	<i>pyro</i>	<i>lac</i>	<i>gal</i>	<i>nic</i>	<i>cha</i>	
Treatments										Number of tested colonies
0 s benzene	1.14a	2.50a	2.31a	1.73a	1.87a	2.28a	4.69a	0.90a	2.56a	410
20 s benzene	1.01a	1.86b	1.51b	1.59a	1.78a	1.74a	3.67a	1.61b	2.54a	415

B										
Group linkage	I	I	I	II	IV	VI	III	VII		
Markers	<i>ribo</i>	<i>paba</i>	<i>bi</i>	<i>w</i>	<i>pyro</i>	<i>lac</i>	<i>gal</i>	<i>nic</i>		Number of tested colonies
Treatments										
0 s benzene	9.28a	10.57a	5.01a	5.17a	13.47a	9.06a	6.12a	2.11a		463
20 s benzene	9.05b	11.18a	4.44a	8.56b	25.13a	18.60b	4.68a	9.01b		392

Note: same letter, χ^2 non-significant differences. Contingency table corrected after Yates at 1% ($p < 0.01$).

Mitotic analyses of untreated UT448//UT184 and *Dp* II-I//UT184 strains

The analyses undertaken allowed observation of the segregation of the genetic markers in all eight fungal chromosomes together. During mitotic divisions a typical Mendelian segregation (1+ : 1-) is usually reported for the involved genetic markers. Genetic disturbances to this behavior, as observed in this work, can certainly be attributed to the benzene treatment allied to the selection against recombinant diploids homozygous for the recessive alleles, in MM. So, distortions in the allelic segregation rates indicate efficiency of benzene fumes to induce DNA recombinogenic lesions with subsequent HI increase.

Mitotic analyses of untreated strains are reported in Table 2. Diploid sectors analyses were performed independently. Table 2 encompasses analyzed data of all individuals of UT448//UT184 altogether. In the control experiment (without benzene), the diploid presents a subtle distortion in the allelic segregation rates (different from 1 : 1), indicating that the

allelic segregation rate results from DNA damage originating from the proper self-replication process. Since this diploid presents normal DNA repair mechanisms such minor alterations are hardly noticed. In similar proportions, the segregation rate alterations affect the pattern of all focused gene markers scattered all over the eight fungal chromosomes.¹⁴

In the untreated diploid strain *Dp* II-I//UT184 it can be seen that significant allelic segregation rate distortions arise due to the low frequency of auxotrophic haploid alleles (Table 2) in MM. Even in the absence of any recombinogenic specific inducer such results evidence that this diploid presents constitutive recombination potentials.

Benzene fumes genotoxic effects

Benzene genotoxic effects have been evidenced (Table 2) in both the diploid strains (UT448//UT184, and *Dp* II-I//UT184) used. HI values are significantly increased in the control strain after the treatment (Fig. 2A). Even after 20 s benzene fumes treatment the control diploid strain (UT448//UT184) presented quite normal patterns of allelic segregation in MM. As previously reported, HI results found in diploid *Dp* II-I//UT184 without treatment were completely different. Benzene treated *Dp* II-I//UT184 also showed higher HI indexes (about 2 times as high) than the UT448//UT184 strain (Fig. 2B). This concurs with previous results¹⁴ when low UV doses were the induction agent. Since a HI increase indicates increased levels of mitotic crossing-over, the present results, albeit indirectly, indicate the potential carcinogenicity of low doses of benzene fumes. HI values higher than 2.0 indicate high recombinogenic potentials.

Fig. 2 "Homozygotization Index" of UT448//UT184 (A) and *Dp* II-I//UT184 (B) diploids strains before benzene fumes treatment (0 s benzene treatment), and after 20 s benzene fumes treatment.

Fig. 3 Homozygotization Index (HI) average in UT448//UT184 e *Dp* II-I//UT184 diploids. Note: HI average values correspond to those presented in Tables 1 and 2.

The analyses suggested that the *Dp II-I/UT184* strain carries a benzene resistance mutation responsible for its survival during the treatments. This resistance locus (*ben*) is located at chromosome VI, about 12% distant from the sodium thiosulfate locus (*sB3*) in the UT184 genome. A more precise location will emerge from other approaches focusing on other genes that may be responsible for gene *ben* resistance regulation.

Fig. 3 shows average HI values for all studied nutritional markers. Increased distortions occurring after several treatments are easily seen.

Conclusions

After such results it is important to emphasize that this is the first time that the recombinogenic (reputedly, carcinogenic) potential of benzene fumes has been determined, even for its submutagenic doses. Even though no evidence on the carcinogenic potential of such low doses is presently available, the main outcome may suggest the need for renewed safety patterns in the working environment of people who are exposed to benzene fumes. Exposure limits determination for benzene contact or fume inhalation are to be determined. Even though the subject here is benzene, the short-term test under consideration will be certainly very efficient and sensitive for evaluating the genotoxicity of many other environmental pollutants.

A. nidulans, a versatile eukaryotic *in vivo* system, was found to be useful in further the clarifying biological action of benzene and understanding the possible modulation of its action by a holistic interaction of many cellular systems. Of course, there may be limitations to the utility of *A. nidulans* as a mammal surrogate due to differences in the molecular environment and the more complex genetic interactions in mammals. However, *A. nidulans* can be proposed as a cell model in the early studies of environmental pollution to provide a rapid screening of biological activities of chemicals.

It was observed that submutagenic benzene concentrations did not induce any mitotic recombination alteration in the diploid strain UT448/UT184 that bears normal DNA repair mechanisms. However increased mitotic recombination frequency was detected in the diploid *Dp II-I/UT184* that despite being proficient in recombinational repair is deficient in DNA excision and repair mechanisms. These characteristics made this strain very convenient for our purposes. This also explains why this strain was chosen as a biological indicator to monitor benzene genotoxic behavior. The observed genotoxic effects (mitotic recombination and homozygotization of auxotrophic recessive mutations) induced by benzene are hypothesized to be accounted for by chemical DNA alterations. Some clear estimations of the extent of DNA damage could be provided by the Comet assay with specific modification for detecting the effects on microorganisms.³⁹⁻⁴¹

In this study, we only assessed the effects of a short acute exposure to benzene fumes to verify if the test on *A. nidulans* was able to detect the genotoxic load of a volatile environmental compound. With respect to the extremely sensitive response of the diploid strain *Dp II-I/UT184*, it will be of interest to assess the suitability of the bioassay under chronic exposure to very low doses representing more usual environmental exposure.

Finally, the location of the gene responding for benzene resistance was determined. It is located at chromosome VI of the haploid strain *Dp II-I*, at 12 cM distant from the *sB3* locus for sodium thiosulfate gene expression. In the studied diploid strain this gene plays a recessive role.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Brazil), CNPq (Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior-Brazil).

References

- 1 V. A. Bohr, M. K. Evans and A. J. Fornace Jr., *Lab. Invest.*, 1989, 61, 143-161.
- 2 F. Fabre and H. Roman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 1667-1671.
- 3 L. M. Hafner and D. G. MacPhee, *Mutat. Res.*, 1991, 263, 179-184.
- 4 G. C. Walker, L. Marsh and L. A. Dodson, *Annu. Rev. Genet.*, 1985, 19, 103-126.
- 5 J. M. H. Vos and P. C. Hanawalt, *Mutat. Res.*, 1985, 220, 205-220.
- 6 J. A. Nickoloff, J. D. Singer, M. F. Hoekstra and F. Heffron, *J. Mol. Biol.*, 1989, 207, 527-541.
- 7 J. L. M. Van der Lubbe, H. J. M. Rosdorff and A. J. Van der Eb, *Mutat. Res.*, 1989, 217, 153-160.
- 8 L. T. A. Pires and T. M. A. D. Zucchi, *Cell. Mol. Biol.*, 1998, 44, 303-313.
- 9 O. Bechor, D. R. Smulski, T. K. Van Dyk, R. A. LaRossa and S. Belkin, *J. Biotechnol.*, 2002, 94, 125-132.
- 10 R. Crebelli, *Mutat. Res.*, 2000, 464, 129-135.
- 11 *Microscale testing in aquatic toxicology*, ed. P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998.
- 12 A. W. Knight, P. O. Keenan, N. J. Goddard, P. R. Fielden and R. M. Walmsley, *J. Environ. Monit.*, 2000, 6, 71-79.
- 13 K. H. R. Baronian, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 19, 953-962.
- 14 L. T. A. Pires and T. M. A. D. Zucchi, *Brazil J. Genet.*, 1994, 17, 371-376.
- 15 Tânia Zucchi, personal communication, Universidade de São Paulo, Brazil, 2004.
- 16 L. MacEachern, R. Snyder and D. L. Laskin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, 117, 147-154.
- 17 R. Ranaldi, B. Bassani, P. Villani, C. C. Lombardi, C. Tanzarella and F. Pacchicotti, *Mutagenesis*, 1998, 13, 453-460.
- 18 J. Major, M. Jakab, G. Kiss and A. Tompa, *Environ. Mol. Mutagen.*, 1994, 23, 137-142.
- 19 J. B. Ward, M. M. Ammenheuser, V. M. Ramanujam, D. L. Morris, E. B. Whorton and M. S. Legaton, *Mutat. Res.*, 1992, 268, 49-57.
- 20 T. M. A. D. Zucchi, *Brazil J. Genet.*, 1990, 13, 409-443.
- 21 A. J. Clutterbuck, in *Genetic maps*, ed. S. J. O'Brien, Cold Spring Harbor, New York, 1993, pp. 71-84.
- 22 J. M. Marin and T. M. A. D. Zucchi, *Rev. Bras. Genet.*, 1991, 14, 9-20.
- 23 T. M. A. D. Zucchi, *Rev. Bras. Genet.*, 1990, 13, 425-443.
- 24 M. A. A. Castro-Prado and T. M. A. D. Zucchi, *Brazil J. Genet.*, 1991, 14, 239-248.
- 25 M. A. A. Castro-Prado and T. M. A. D. Zucchi, *Brazil J. Genet.*, 1991, 14, 249-260.
- 26 M. A. A. Castro-Prado and T. M. A. D. Zucchi, *Brazil J. Genet.*, 1992, 15, 777-788.
- 27 J. A. Roper, *Experientia*, 1952, 8, 263-267.
- 28 E. Forbès, *Heredity*, 1959, 13, 67-80.
- 29 P. Lhoas, *Nature*, 1961, 190, 744.
- 30 C. Morpurgo, *Newsletter*, 1961, 2, 10.
- 31 T. M. A. D. Zucchi, *Cell. Mol. Biol.*, 1996, 42, 889-904.
- 32 A. Watanabe, I. Fuji, U. Sankawa, M. E. Mayorga, W. E. Timberlake and Y. Ebizuka, *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40, 91-94.
- 33 M. E. Mayorga and W. E. Timberlake, *Genetics*, 1990, 126, 73-79.
- 34 M. E. Mayorga and W. E. Timberlake, *Mol. Gen. Genet.*, 1992, 235, 205-212.
- 35 A. Watanabe, Y. Ono, I. Fuji, U. Sankawa, M. E. Mayorga, W. E. Timberlake and Y. Ebizuka, *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 7733-7736.
- 36 J. Tilburn, F. Roussel and C. Scazzocchio, *Genetics*, 1990, 126, 81-90.
- 37 W. Timberlake and M. A. Marshall, *Science*, 1998, 244, 1313-1317.
- 38 C. Van de Vate and G. J. O. Jansen, *Genet. Res.*, 1978, 31, 29-52.
- 39 P. Polj, A. Buschini, A. Ficarella, F. M. Restivo, T. M. A. D. Zucchi and C. Rossi, *Neoplasma*, 1999, 46, 74-75.
- 40 G. Miloshev, I. Mihaylov and B. Boyka Anachkova, *Mutat. Res.*, 2002, 513, 69-74.
- 41 B. Lah, G. Gorjanc, F. V. Nekrep and R. Marinsek-Logar, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2004, 72, 607-616.

BIOSEGURANÇA EM BIOTECNOLOGIA

Pedro Canisio Binsfeld
(organizador)

EDITORA INTERCIÊNCIA

Copyright © 2004 by Pedro Canisio Binsfeld

Direitos Reservados em 2004 por **Editora Interciência Ltda.**

Diagramação: Vera Lúcia da Cruz Barros

Capa: Cleber Luis dos Santos

Revisão Ortográfica: Maria Paula da Mata Ribeiro

CIP-Brasil. Catalogação-na-Fonte
Sindicato Nacional dos Editores de Livros, RJ

Biossegurança em biotecnologia
/ Pedro Canisio Binsfeld (organizador). - Rio de Janeiro :
Interciência, 2004.

Inclui referências
ISBN: 85-7193-112-7

1. Biossegurança. 2. Biotecnologia. I. Binsfeld, Pedro
Canisio.

CDD 620.8
CDU 62

É proibida a reprodução total ou parcial, por quaisquer meios,
sem autorização por escrito da editora.

www.editorainterciencia.com.br

Editora Interciência Ltda.

Rua Verna Magalhães, 66 - Engenho Novo
Rio de Janeiro - RJ - 20710-290

Tel.:(21) 2581-9378/2241-6916 - Fax:(21) 2501-4760

e-mail: vendas@editorainterciencia.com.br

Impresso no Brasil - *Printed in Brazil*

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 alcali 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*, espécies 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 (Heggestad, 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 (Heggestad, 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). Mudas intactas (com cerca de 45 dias, desde a germinação) foram usados 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 of da 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 maquinaria 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 maquinaria 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. Contam.**, 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*. **Toxicol. 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.