

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO ARROIO LUIZ RAU NA BACIA DO RIO DOS SINOS, RS, BRASIL, COM O USO DE <i>TRADESCANTIA</i>.	24
POTENCIAL GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO AO ALUMÍNIO EM PEIXES DA ESPÉCIE <i>ASTYANAX JACUHIENSIS</i>.	28
EFEITO DO EXTRATO DE <i>GINGKO BILOBA</i> SOBRE A NEUROBIOLOGIA: UMA REVISÃO.	33
ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS EM PEIXES DO RIO IJUÍ.	38
BIOMONITORAMENTO ATIVO DA GENOTOXICIDADE DO AR EM ÁREAS COM DIFERENTES IMPACTOS ANTRÓPICOS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS DO SUL, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.	43
EFEITOS DA INFECÇÃO POR ADENOVIRUS 5 SOBRE A EXPRESSÃO DE QUATRO GENES ENVOLVIDOS NO CICLO CELULAR.	27

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO ARROIO LUIZ RAU NA BACIA DO RIO DOS SINOS, RS, BRASIL, COM O USO DE *TRADESCANTIA*

Daiane Trindade Costa (Feevale)¹
Gustavo Marques da Costa (Feevale)²
Camila Tamires Petry (Feevale)³
Mara Betânia Brizola Cassanego (Feevale)⁴
Annette Droste (Feevale)⁵

Palavras-chave: Biomonitoramento. Poluentes. Genotoxicidade. Corpos hídricos.

1 INTRODUÇÃO

A Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, que faz parte da região metropolitana de Porto Alegre, se caracteriza por uma alta densidade populacional e industrial. Está localizada a nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, entre os paralelos 29° e 30° sul, com um curso d'água principal de 190 km e com área total de 3.820 km². Esta Bacia já apresentou a qualidade de água mais baixa do Brasil. Dentre os principais afluentes do Rio dos Sinos, no trecho inferior, destaca-se o arroio Luiz Rau, que nasce, percorre e drena a região central do município de Novo Hamburgo (FIGUEIREDO et al., 2010; FEPAM, 2013).

Neste contexto, a preocupação com o estado de degradação dos corpos hídricos induz a necessidade de se estabelecer métodos analíticos eficientes, tanto em nível da própria avaliação quanto auxiliares nas tomadas de decisões nos processos de gestão ambiental (RODRIGUES e CASTRO 2008). Sendo assim, o biomonitoramento com o teste Trad-MCN em *Tradescantia* constitui uma ferramenta adicional para avaliação da qualidade da água de corpos hídricos e águas residuais provenientes de esgotos domésticos (MIELLI et al., 2009; THEWES et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi realizar a avaliação da qualidade da água do arroio Luiz Rau no município de Novo Hamburgo, por meio do bioensaio com *Tradescantia* (Trad-MCN).

1- Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS e Bolsista de Aperfeiçoamento Científico da Universidade Feevale (biodaia@gmail.com);

2- Mestre em Qualidade Ambiental pela Universidade Feevale, Doutorando em Qualidade Ambiental na Universidade Feevale e Bolsista - CAPES/FAPERGS;

3- Graduando em Ciências Biológicas na Universidade Feevale e Bolsista de Iniciação Científica;

4- Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, Doutoranda em Qualidade Ambiental na Universidade Feevale e Bolsista - CAPES/PROSUP;

5- Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Docente e Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental da Universidade Feevale.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Estudos sobre a qualidade de corpos hídricos com o uso de bioindicadores como *Tradescantia* são reconhecidos mundialmente como uma importante ferramenta para a avaliação de efeitos genotóxicos de poluentes presentes em ambientes aquáticos. *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt. var. *purpurea* Boom é uma espécie selvagem, que apresenta alta sensibilidade a agentes genotóxicos, sendo utilizada em biomonitoramentos da qualidade da água, através do teste de micronúcleos (Trad-MCN) (MIELLI et al., 2009; THEWES et al., 2011). O teste Trad-MCN baseia-se na formação e contagem de micronúcleos nas células-mãe dos grãos de pólen na fase de tétrades (ANDRADE JÚNIOR et al., 2008; MEIRELES et al., 2009).

O monitoramento da qualidade da água normalmente é realizado através da avaliação físico-química e bacteriológica para indicação de potabilidade ou usos múltiplos, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005). No entanto, estes parâmetros quando analisados isoladamente, podem subestimar a real magnitude dos danos que estão sendo causados aos ambientes aquáticos (KARR e CHU, 1999).

3 METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de água em dois pontos no arroio Luiz Rau (próximo à nascente: 29° 38'14,78" S 51°08'22,53" W, 43 m alt e foz: 29°43'4.45"S 51° 7'55.02" W, 9 m alt.), nos meses de julho de 2012 e janeiro de 2013. O transporte das amostras foi feito de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT/NBR 9898/1987) e o Standard Methods (APHA, 2005). Após 24 h de adaptação, as inflorescências foram expostas por 8 h às amostras de água do arroio e recuperadas por 24 h em água destilada. A exposição das plantas, fixação das inflorescências, armazenamento, preparação das lâminas e a análise dos dados foram realizados de acordo com Thewes et al. (2011). Sete lâminas foram preparadas para cada amostra. Simultaneamente, foi realizado o controle negativo, substituindo a água das amostras por água destilada. Frequências de micronúcleos obtidas nas amostras e no controle em cada mês foram comparadas por ANOVA seguida do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

No inverno, os botões florais expostos às amostras de água da área da nascente e da foz apresentaram as maiores frequências de MCN (4,80 e 5,76, respectivamente), não diferindo significativamente entre si. No entanto, foram estatisticamente diferentes das amostras do controle negativo (2,0) ($F=15,213$; $p<0,001$). No verão, as frequências de MCN observadas nos botões expostos às amostras de água da área da nascente e da foz também foram estatisticamente iguais (3,23 e 3,90, respectivamente) e significativamente superiores ao controle negativo (1,33) ($F=19,633$; $p<0,001$).

5 DISCUSSÃO

As amostras de água da área da nascente e da foz do arroio indicaram a presença de poluentes com potenciais efeitos genotóxicos, uma vez que as frequências de MCN observadas foram superiores às consideradas por Pereira et al.(2013) como resultado de mutações espontâneas (2,0 MCN/100 tétrades), que podem ocorrer em ambientes desprovidos de poluição.

Em ambas as estações do ano, os botões florais expostos à água tanto da área da nascente quanto da foz apresentaram frequências de MCN estatisticamente iguais, evidenciando a presença de poluentes desde o início do curso d'água, corroborando com o estudo de Robaina et al. (2002), que verificaram condições de risco moderado a alto, em todos os pontos, para alguns metais pesados analisados em amostras de água do arroio Luiz Rau.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentaram níveis de genotoxicidade nos pontos amostrados, reforçando a importância do biomonitoramento com o uso do bioensaio Trad-MCN como um parâmetro para integrar a avaliação da qualidade de corpos hídricos. Considerando que o arroio Luiz Rau é um importante afluente do Rio dos Sinos, a poluição de suas águas se reflete no comprometimento da qualidade das águas da bacia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT/NBR 9898 - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores**. Rio de Janeiro, 1987.
- ANDRADE JÚNIOR, S. J. ; SANTOS, J. C. S.; OLIVEIRA, J. L. ; CERQUEIRA, E. M. M.; MEIRELES, J. R. C. Micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv.purpurea Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição aérea urbana. **Acta Scientiarum Biological Sciences** (UEM), v. 30, n. 3, July, p. 295-301, 2008.
- APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21st ed. Washington DC, 2005.
- BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 03/2005. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2013.
- FEPAM, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_sinos/sinos.asp>. Acesso em: 19 mar. 2013.
- FIGUEIREDO, J. A. S., DRUMM, E., RODRIGUES, M. A. S., SPILKI, F. R. The Rio dos Sinos watershed: an economic and social space and its interface with environmental status. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, n.4, p.1131-1136, 2010.
- KARR, J., CHU, E. W.. **Restoring life in running waters: better biological monitoring**. Washington: Inland Press, 2009.
- MEIRELES, J., ROCHA, R., NETO, A. C., CERQUEIRA, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia*(Trad-MCN). **Mutation Research**, v. 675, p.46-50, 2009.
- MIELLI, A. C., MATTA, M. E. M., NERSESYAN, A., SALDIVA, P. H. N., UMBUZEIRO, G. A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v.672, p.51-54, 2009.
- ROBAINA, L. E.; FORMOSO, M. L. L. e PIRES, C. A. F.. Metais pesados nos sedimentos de corrente, como indicadores de risco ambiental- Vale do Rio dos Sinos, RS. **Revista do Instituto Geológico**, v. 23, n. 2, p. 35-47, 2002.
- RODRIGUES A. S. L., CASTRO, P. T. A. Protocolos de Avaliação Rápida: Instrumentos Complementares no Monitoramento dos Recursos Hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.13, n.1, p.161-170, 2008.
- THEWES, M. R., ENDRES JUNIOR, D., DROSTE, A.,. Genotoxicity biomonitoring of sewage in two municipal wastewater treatment plants using the *Tradescantia pallida* var. *purpurea* bioassay. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.4, p. 689-693, 2011.
- UMBUZEIRO, G. A., COIMBRÃO, C. A., KUMMROW, F., LOBO, D. J. A. SALDIVA, P. H. N., 2007. Mutagenic activity assessment of Cristais River, São Paulo, Brazil, using the blue rayon / *Salmonella* microsome and the *Tradescantia pallida* micronuclei assays. **Journal Brazilian Society Ecotoxicology**, v.2, p.163-171.

POTENCIAL GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO AO ALUMÍNIO EM PEIXES DA ESPÉCIE *Astyanax jacuhiensis*

Angélica Goldoni¹, Thaís Dalzochio¹, Günther Gehlen² e Luciano Basso da Silva³

Universidade Feevale

Palavras-chave: Alumínio. Peixes. Genotoxicidade. Teste de micronúcleos.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a contaminação dos corpos hídricos por metais provenientes de diversas fontes de contaminação constitui-se em um grande risco para a saúde das populações aquáticas e da população humana que faz uso destes recursos. Levando em consideração a escassez de informações acerca dos possíveis efeitos de alguns destes metais sobre o DNA, este trabalho visa avaliar, através do teste de micronúcleos, o potencial genotóxico do alumínio em peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O alumínio é dos elementos mais abundantes nos ecossistemas. Sob condições naturais, é liberado nos corpos hídricos através da erosão de rochas ou do solo, podendo alcançar altas concentrações na água. No entanto, nos últimos anos, os níveis ambientais deste metal têm aumentado em decorrência de diversas atividades antropogênicas, como o tratamento da água e a lixiviação ocasionada por operações de mineração e aterros industriais (García-Medina *et al.*, 2013). O alumínio é considerado como sendo um metal nocivo aos ecossistemas, responsável por efeitos tóxicos com sérias consequências ecológicas, como alterações hematológicas, respiratórias, metabólicas e reprodutivas em peixes (Correia *et al.*, 2010).

¹Mestre em Qualidade Ambiental pela Universidade Feevale

²Doutor em Neurociências pela Universidade Federal do RS (UFRGS)

³Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do RS (UFRGS)

Biomarcadores de danos de DNA são ferramentas valiosas para a avaliação dos efeitos agudos e crônicos em organismos aquáticos expostos a substâncias genotóxicas, que podem levar à indução de anormalidades morfológicas e processos de carcinogênese, além da indução de alterações no DNA que são passadas para as futuras gerações (Monserrat *et al.*, 2007). Dentre os diversos ensaios disponíveis para a detecção de danos ao DNA, o teste de micronúcleos está entre os mais utilizados atualmente.

Os micronúcleos (MN) podem se originar tanto por fragmentos cromossômicos como por cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo principal durante a divisão celular (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Diversos mecanismos estão envolvidos na formação de micronúcleos, como quebras cromossômicas e erros no fuso mitótico. Assim, o teste de micronúcleos detecta tanto agentes clastogênicos como aneugênicos, podendo ser aplicado a praticamente qualquer tipo celular (Brunetti *et al.*, 1988). Em peixes, especificamente, outros grupos de anormalidades nucleares, como invaginações, brotos e células binucleadas, têm sido avaliadas durante o teste de micronúcleos (Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000; Pacheco & Santos, 2002; Matsumoto *et al.*, 2006).

Considerando-se os altos níveis de alumínio encontrados nos ecossistemas aquáticos em diversos trabalhos (Camargo *et al.*, 2009; Blume *et al.*, 2010), bem como a necessidade de um melhor entendimento acerca da relação entre alterações no DNA e a exposição a este metal, o objetivo do presente trabalho é avaliar a presença de danos genéticos em peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis*, expostos a duas concentrações de alumínio.

METODOLOGIA

Peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis* foram obtidos de um piscicultor local e aclimatados em laboratório durante sete dias. Após o período de aclimação, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos (n por grupo = 7): controle (água tratada sem cloro), Al 0,3 mg/L e Al 30 mg/L, em pH neutro. A concentração de 0,3 mg/L foi baseada no limite máximo permitido para água potável, de acordo com o decreto 518/2004 do Ministério da Saúde, enquanto a concentração de 30 mg/L baseia-se em um estudo realizado em um ponto do trecho inferior do Rio dos Sinos (Blume *et al.*, 2010). Após 72 horas de exposição, os animais foram sacrificados para obtenção de amostras de sangue periférico.

O sangue foi coletado a partir de um corte na região caudal e diretamente gotejado sobre uma lâmina limpa, sendo realizado um esfregaço com o auxílio de outra lâmina. O material foi então fixado em etanol absoluto durante 10 minutos e corado com Giemsa 5%. Todas as lâminas foram codificadas e analisadas sem o conhecimento do grupo de peixes aos quais pertenciam. A análise das amostras foi realizada com a utilização de microscópio óptico, examinando-se 2000 eritrócitos de cada peixe. Os critérios para a identificação de micronúcleos foram os mesmos adotados por Grisolia (2002): (a) seu diâmetro deve ser menor que um terço do diâmetro do núcleo principal, (b) deve estar claramente separado do núcleo principal e (c) deve possuir coloração e intensidade semelhantes às do núcleo principal. Em relação à análise de anormalidades nucleares, foram considerados núcleos com invaginações, brotos e células binucleadas

A comparação das frequências de micronúcleos e anormalidades nucleares foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, considerando um nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os resultados das frequências de micronúcleos e anormalidades nucleares encontradas nos peixes expostos às duas concentrações de alumínio e nos animais do grupo controle.

Tabela 1. Frequência/1.000 células do número de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN) dos indivíduos analisados. Média \pm desvio padrão.

Grupo	n	MN/1000	AN/1000
Controle	7	0,00 \pm 0,00	1,29 \pm 1,95
Alumínio 0,3 mg/L	7	0,21 \pm 0,27	1,64 \pm 1,35
Alumínio 30 mg/L	7	0,14 \pm 0,24	1,50 \pm 1,00
p		0,17	0,9

Embora os animais expostos às duas concentrações de alumínio tenham apresentado uma maior média de micronúcleos e anormalidade nucleares em relação ao grupo controle, não foram encontradas diferenças significativas entre a frequência de micronúcleos ($p = 0,17$) e anormalidades ($p = 0,9$) dos dois grupos expostos, em comparação com o grupo controle.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam que, nas condições utilizadas, o alumínio não apresenta efeitos genotóxicos em peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis*. Embora já existam relatos de estudos acerca do potencial genotóxico do alumínio em peixes, ainda não há um consenso a respeito dos mecanismos de indução de danos ao DNA em animais expostos a este metal. Em um estudo realizado por Galindo e colaboradores (2010), não foram encontradas diferenças significativas entre a frequência de micronúcleos em exemplares da espécie *Prochilodus lineatus* expostos a 1 mg/L de alumínio durante 6, 24 e 96 horas e o grupo controle. Entretanto, neste mesmo estudo, a frequência de anormalidades nucleares dos indivíduos expostos mostrou-se significativamente maior do que a frequência dos animais do grupo controle. García-Medina e colaboradores (2013), avaliando os efeitos genotóxicos de três concentrações de alumínio (0,05 mg/L, 120 mg/L e 239 mg/L) em peixes da espécie *Cyprinus carpio*, encontraram um aumento da frequência de micronúcleos nos animais após 12, 24 e 48 horas. No entanto, após 72 e 96 horas de exposição, estas frequências sofreram um decréscimo, sugerindo que, naquela espécie, o pico máximo da indução de formação de micronúcleos por alumínio ocorra em até 48 horas. Os resultados do presente trabalho, bem como os resultados de estudos publicados anteriormente, demonstram que o potencial genotóxico do alumínio depende de diversos fatores, tais como a espécie utilizada, o tempo de exposição e as concentrações selecionadas para estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho visa contribuir para um melhor entendimento do potencial genotóxico do alumínio em peixes. Ressalta-se a importância da realização de novos estudos, levando em consideração exposições crônicas e demais concentrações encontradas em ambientes naturais.

REFERÊNCIAS

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v. 343, p. 121-135. 1995.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, v. 467, p. 177-186. 2000.
- BLUME, K. K et al. Water quality assessment of the Sinos River, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 70, p. 1185-1193. 2010.
- BRUNETTI, R. et al. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. *Marine Ecology Progress Series*, v. 44, p. 65-68. 1988.
- CAMARGO, M. M. P. et al. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, v. 94, p. 40-46. 2009.
- CORREIA, T. G et al. Aluminium as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 151, p. 461-466. 2010.
- GALINDO, B. A. et al. Genotoxic effects of aluminium in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 212, p. 419-428. 2010.
- GARCÍA-MEDINA, S. et al. The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminium levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.010>
- MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root tips. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 148-158. 2006.
- MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 146, p. 221-234. 2007.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene and β -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. *Environment International*, v. 28, p. 285-293. 2002.

Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* sobre a neurobiologia: uma revisão

Jéssica Saldanha Krai, Universidade Feevale*

Ana Luiza Ziulkoski, Universidade Feevale**

Fabiana Michelsen de Andrade, Universidade Feevale***

Palavras chave: Fitoterápicos. *Ginkgo biloba*. Neurogênese.

1. INTRODUÇÃO:

Em resposta à demanda da população pelo uso de fitoterápicos, e como tentativa de promover o uso racional desta classe de fármacos nota-se a grande necessidade da elucidação do mecanismo de ação dos mesmos, tendo em vista que estudos nesta área são escassos.

Um dos fitoterápicos que se destaca pela prevalência de seu uso em relação aos demais fitoterápicos é o *Ginkgo biloba* (Marlière, 2008). Este fármaco é indicado para os quadros de vertigens, zumbidos resultantes de distúrbios circulatórios gerais e distúrbios circulatórios periféricos e insuficiência vascular cerebral (Nicolleti, 2007). Em um número menor de estudos, este fitoterápico tem tido efeitos sobre a aprendizagem, a concentração e a memória (Yoo, 2011). Porém pouco se sabe sobre o mecanismo de ação deste ativo.

Tendo em vista este cenário, é evidente a importância da pesquisa envolvendo medicamentos fitoterápicos. Estes estudos deverão contribuir para a elucidação de seu mecanismo de ação e interação com outros fármacos, para somente então ser possível a real segurança no atendimento em programas de saúde pública que envolvam estes medicamentos. Neste sentido, modelos animais e cultivos celulares são ferramentas que fornecem subsídios para a elucidação da atividade farmacológica dos medicamentos fitoterápicos. Neste trabalho, será feita uma revisão destes tipos de investigações publicadas na literatura, que tenham como foco o efeito do fitoterápico *Ginkgo biloba* sobre parâmetros neurológicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

A demanda de medicamentos fitoterápicos na terapêutica brasileira é notória e, segundo Rates (2001), a utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto a civilização humana. Esta prática na maioria das vezes é realizada através da utilização de conhecimentos empíricos étnicos sobre a atividade farmacológica das plantas passando de geração para geração. Entretanto o uso deste tipo de medicamento muitas vezes ocorre devido à crença de que o mesmo, por se tratar de um produto natural, não confere

*Possui Graduação em Ciências Farmacêuticas (2007) pela Universidade Feevale. Atualmente participa do programa Aperfeiçoamento Científico da Universidade Feevale.

**Possui Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica (2006), Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica e graduação em Farmácia (1998) com Habilitação em Farmácia Industrial (2001), todos pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Atualmente é professora titular da Universidade Feevale.

***Possui Pós-Doutorado pela Newcastle University(UK) (2012), Doutorado e Mestrado em Genética e Biologia Molecular (2003, 1999), e Graduação em Ciências Biológicas(1996), todos pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Atualmente é professora titular da Universidade Feevale.

toxicidade, efeitos indesejados ou interação com os fármacos que o indivíduo já utiliza.

Nicoletti e cols (2007) ressaltam a importância do conhecimento dos efeitos dos fitoterápicos, pois quando utilizados em associações com outros medicamentos químicos ou outros fitoterápicos podem causar interações medicamentosas. Ainda que sejam tantas as possibilidades e a demanda de desenvolvimento de medicamentos obtidos de ativos naturais, se observa que os estudos envolvendo fitoterápicos são escassos, frente à sua grande utilização pela população.

Em resposta à demanda da população pelo uso de fitoterápicos, e como tentativa de regulamentar o uso e aumentar a segurança para o paciente que utiliza esta classe de medicamentos a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou a Resolução 89/2004 (Brasil, 2004), que descreve as principais ações terapêuticas e normatiza a venda sob prescrição médica de alguns fitoterápicos como *Ginkgo biloba* (L.), *Centella asiatica* (L.) e *Echinacea purpurea*.

Embora existam alguns estudos a respeito do uso, da toxicidade, dos mecanismos de ação e da eficácia das plantas medicinais, segundo Santos (2011) a literatura científica ainda é precária no sentido de se conhecer como fitoterápicos estão sendo usados, quais são seus reais benefícios e como se poderá capacitar os profissionais para o aconselhamento da utilização como medicina integrativa no SUS.

Segundo Rates (2001), o uso racional de medicamentos implica na obtenção do melhor efeito, com a utilização pelo menor período de tempo possível. Ainda que pareça óbvio, a prática tem demonstrado que raramente os medicamentos são utilizados de forma racional. A promoção do uso racional de medicamentos pode ser fundamentada nos seguintes aspectos: seleção, necessidade, eficácia, segurança, custo e qualidade, disponibilidade, programas de educação para profissionais da saúde e pacientes, padrões adequados para a prescrição de medicamentos e acompanhamento da utilização de medicamentos.

Ginkgo biloba (L.) da família botânica Ginkgoaceae é uma árvore de origem oriental que vem sendo amplamente utilizada no Brasil em função de suas indicações farmacológicas para o tratamento de vertigens e zumbidos (resultantes de distúrbios circulatórios), de distúrbios circulatórios periféricos (claudicação intermitente) e de insuficiência vascular cerebral (Brasill, 2004). Em um número menor de estudos, este fitoterápico tem tido efeitos sobre a aprendizagem, a concentração e a memória, como observado no estudo de Yoo e cols, (2011).

Marliére e cols 2008 realizaram o único estudo brasileiro que avaliou o uso de fitoterápicos na terceira idade. Nesta amostra de Belo Horizonte (MG), pode-se observar que

o *Ginkgo biloba* esteve entre os medicamentos desta classe mais utilizados nesta faixa etária. Esta planta é uma das espécies vegetais com maior número de derivados registrados no país (Carvalho, A.C.B., 2008). Possui aproximadamente 50 medicamentos fitoterápicos desenvolvidos por diversas indústrias farmacêuticas brasileiras, utilizando este extrato como princípio ativo, e que tiveram seu registro deferido e publicado no Diário Oficial da União (DOU). Destes medicamentos, doze possuem registro ativo atualmente, segundo site da ANVISA. Além da industrialização de fitoterápicos a base de extrato de *Ginkgo biloba*, este ativo também é manipulado em Farmácias Magistrais.

Desde que foram detectados tratamentos com extratos da planta, uma série de outras abordagens tem sido realizadas, em uma tentativa de confirmar e entender a provável influência deste fitoterápico sobre a neurobiologia. Diversos estudos de associação em diferentes populações têm procurado associar o uso de extratos da planta com melhora de memória tanto em indivíduos com demência, quanto em pessoas com queixas de memória sem o diagnóstico de demência.

A partir destas lacunas, alguns trabalhos têm sido focados em avaliar os efeitos deste fitoterápico em modelos animais e cultivos celulares, uma vez que o efeito real dos componentes do *Ginkgo biloba* sobre a fisiologia neuronal ainda não é compreendido. Este trabalho propõe uma revisão dos dados referentes à esta questão, disponíveis na literatura científica.

3. METODOLOGIA:

O procedimento metodológico utilizado para esta revisão científica foi pesquisa de referências utilizando os sites “PubMed” e “Scielo”. Para a realização da pesquisa foram utilizadas as palavras chave: “*Ginkgo biloba* e memória”, “*Ginkgo biloba* e cultivo celular”, “*Ginkgo biloba* e neurogênese”. Todos os artigos encontrados sobre o assunto foram utilizados, sem limite de tempo.

4. RESULTADOS:

Em 1992, uma revisão publicada na revista Lancet avaliou os resultados de 40 estudos de intervenção, sendo que 39 deles demonstram ao menos um efeito pequeno na melhora da memória (Kleijnem e Knipschild, 1992). No entanto, a qualidade metodológica de muitos destes estudos foi considerada como sendo baixa. Após a publicação desta revisão, intervenções mais adequadas foram realizadas, mas a maior parte delas demonstrou efeito de

melhora de memória somente em pacientes com demência, como o estudo do North American Egb Study Group (Le Bars et al, 1997). Ainda assim, intervenções com boa qualidade metodológica como a realizada por de van Dongen et al (2003) não detectaram nenhum efeito significativo do *Ginkgo biloba* sobre a memória de pacientes com demência ou de indivíduos com outros déficits de memória.

Dados de modelos animais estão disponíveis em um menor número de estudos, a partir de 1986, quando Krieglstein e cols evidenciaram que o tratamento com extratos da planta provocou aumento de fluxo sanguíneo cerebral. Em 1998 Tadano e cols publicaram que a planta conferiu melhora na memória em camundongos. Estudos como o de Yoo e cols, 2011 e Tchanchou e cols, 2007 utilizando o extrato do *Ginkgo biloba* em modelos em animais tem demonstrado o efeito da planta com a neurogênese e sinaptogênese, bem como efeitos benéficos em modelos de doença de Alzheimer. No entanto, nenhum destes estudos procurou identificar as vias moleculares associadas a estes efeitos.

5. DISCUSSÃO:

Mesmo com a alta taxa de consumo deste fitoterápico na prática médica, os resultados de estudos científicos ainda são contraditórios. Relatos como os de Van Dongeno e cols (2002) ainda demonstram a ausência de efeito significativo do *Ginkgo biloba* sobre a memória de pacientes com demência ou de indivíduos com outros déficits de memória. Estudos com animais tendem a ser mais concordantes, no entanto ainda não demonstram o mecanismo de ação desse medicamento.

Tendo em vista o amplo consumo de fitoterápicos a base de *Ginkgo biloba* no país, bem como a escassez de estudos utilizando extrato padronizado (Egb761) para identificar seu mecanismo de ação em modelos patológicos ou não, é clara a necessidade de estudos *in vitro* em linhagens celulares. Somente utilizando-se desta abordagem, será possível avaliar a ação deste composto sobre o funcionamento neuronal.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O presente trabalho demonstra a necessidade de investigações utilizando cultivos celulares para o maior entendimento dos efeitos do *Ginkgo biloba* sobre a neurobiologia. Somente com estes dados disponíveis será possível a avaliação de suas influências sobre as células humanas, possibilitando desta forma, uma utilização racional deste fitoterápico.

Referências:

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 89. Determina a publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. Diário Oficial da União, 16 de março de 2004.
- CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. (2008) Situação do Registro de medicamentos Fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(2): 314-319, Abr./Jun.
- DONGEN, M. V.; ROSSUM, E.V.; KESSELS, A.; SIELHORST, H.; KNIPSCHILD, P. (2003) Ginkgo for elderly people with dementia and age-associated memory impairment: a randomized clinical Trial. *Journal of Clinical Epidemiology* 56: 367–376.
- KLEIJNEM E KNIPSCHILD (1992) Ginkgo biloba. *The Lancet*. Vol. 340. Nov 7.
- KRIEGLSTEIN J, BECK T, SEIBERT A (1986). Influence of an extract of Ginkgo biloba on cerebral blood flow and metabolism. *Life Sci* 39 : 2327-2334.
- LE BARS, P.L.; KATZ M.M.; BERMAN N. ET AL (1997). A placebo-controlled, doubleblind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. *JAMA* 1997; 278:1327–32.
- Marlière, L.D.P.; Ribeiro, A.Q.; Brandão, M.G.L.; Klein, C.H.; Acurcio, F.A. (2008) Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18 (Supl.): 754-760, Dez.
- NICOLETTI, M.A.; OLIVEIRA-JUNIOR, M.A.; BERTASSO, C.C.; CAPOROSSI, P.Y.; TAVARES, A.P.L. (2007) Principais Interações no uso de Medicamentos Fitoterápicos. *Infarma*, V.19, nº ½.
- RATES, S.M.K. (2001) Uso Racional de Fitoterápicos: Uma abordagem no ensino de Farmacognosia. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 11, n. 2, p.57-59.
- SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. (2011) Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.13, n.4, p.486-491.
- TADANO T, NAKAGAWASAI O, TAN-NO K, et al (1998). Effects of ginkgo biloba extract on impairment of learning induced by cerebral ischemia in mice. *Am J Chin Med* 26: 127-132.
- YOO, D.Y.; NAM, Y.Y.; KIM, W. ET AL (2011) Effects of Ginkgo biloba Extract on Promotion of Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus in C57BL/6 Mice. *J. Vet. Med. Sci.* 73(1): 71–76.

Internet :

Consulta de Medicamentos Registrados com Estrato de Ginkgo biloba Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp> . Acesso em 10 julho. 2013

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS EM PEIXES DO RIO IJUÍ

¹ Emitério da R. Neto. Bolsista CAPES/FAPERGS. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul.

² Jeferson Rodrigues Batista. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul.

³ Günther Gehlen. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul.

³ Luciano Basso da Silva. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Poluição aquática, histopatologia, teste de micronúcleos, peixes.

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos sofrem contaminações de origem urbana, industrial e agrícola. A composição de contaminantes varia de acordo com a atividade geradora, sendo que muitos apresentam substâncias genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas a diversas formas de vida incluindo a espécie humana.

Em função da genotoxicidade de determinados poluentes, tornam-se imprescindíveis estudos que avaliem a sua ação nos organismos e também no ecossistema como um todo. Os trabalhos de genética toxicológica contribuem para a detecção de ecossistemas aquáticos contaminados e serve como subsídio para a tomada de medidas que visem à adequação dos níveis de poluentes descartados nos corpos d'água em concentrações não prejudiciais ao ecossistema. Neste contexto, este trabalho tem o objetivo de monitorar a genotoxicidade do Rio Ijuí utilizando o teste de micronúcleo em peixes e de análises de danos histológicos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os ambientes aquáticos são utilizados para diferentes finalidades, destacando-se como fonte de água para abastecimento das populações humanas, geração de energia, irrigação, navegação, aquicultura, além de importância paisagística (Sperling, 1993). Além disso, estes ambientes têm

¹ Doutorando em Qualidade Ambiental (Feevale). Bolsista Capes/Fapergs.

² Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade Feevale.

³ Doutor em Ciências Biológicas (neurociências). Universidade Feevale.

³ Doutor em Genética e Biologias Molecular. Orientador do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental (Feevale).

sido utilizados como meio de descarte de diferentes produtos (White e Rasmussen, 1998), muitos deles com efeitos danosos sobre o equilíbrio natural dos ecossistemas aquáticos (Van der Werf, 1996).

A contaminação de ambientes aquáticos por poluentes químicos tóxicos pode apresentar diferentes origens. Uma delas pode ser a agricultura que utiliza em sua prática atual diversos tipos de agrotóxicos com o intuito de combater organismos indesejáveis. Estes agrotóxicos podem alcançar os corpos de água através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações (Tomita e Beyruth, 2002).

A poluição proveniente do descarte de diferentes tipos de efluentes nos ambientes aquáticos potencializa o risco de danos genéticos e de câncer nos organismos que ali habitam e também ao Homem (Stahl, 1991). Substâncias genotóxicas podem não contaminar apenas os organismos aquáticos por si só, mas sim o ecossistema inteiro podendo afetar os humanos através da ingestão desses organismos na alimentação (Von Burg e Liu, 1993).

Os peixes são considerados bons organismos para análise da genotoxicidade de ambientes aquáticos, pois acumulam poluentes diretamente através da água contaminada ou indiretamente pela ingestão de outros organismos contaminados (Matsumoto et al., 2006). O método de análise da ação de compostos mutagênicos mais utilizado em peixes é o teste de micronúcleo (MN) (Al-Sabti e Metcalf, 1988; Udroui, 2006). Outro tipo de biomarcador importante em peixes são as alterações histológicas, as quais constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (Hinton et al., 1992; Schwaiger et al., 1997). Melletti et al. (2003) destacam a análise de danos causados nas brânquias de peixes devido à sensibilidade deste tecido, reforçando que estudos histopatológicos podem revelar efeitos tóxicos, constituindo ferramenta útil na avaliação de risco dos agentes tóxicos nos ambientes aquáticos.

A Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí pertence à Região Hidrográfica do Uruguai, destacando-se as atividades econômicas ligadas ao setor primário, predominando as lavouras de soja. Alguns municípios desta bacia apresentam também os setores secundários e/ou terciários mais desenvolvidos. Os principais usos da água se destinam a irrigação e ao abastecimento público (Profill, 2011). Como principais problemas ambientais da região, citam-se a descarga de esgotos sem tratamento nos corpos hídricos; atividades agrícolas sem utilização de práticas de conservação dos solos (Fepam, 2010). Diante destas fontes de contaminação, torna-se importante monitorar a genotoxicidade das águas da Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí, como forma de avaliar a qualidade desses ambientes.

METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho, foram monitorados 3 pontos ao longo do rio Ijuí, nos municípios de Ijuí, Santo Ângelo e Pirapó (pontos 1, 2 e 3, respectivamente). Foram realizadas duas coletas de peixes (lambari) nos pontos selecionados, em julho (inverno) de 2012 e em janeiro (verão) de 2013.

Após a coleta, lâminas com esfregaços sanguíneos foram preparadas para análise de micronúcleos e anormalidade nucleares, de acordo com Grisolia (2002) e Carrasco et. al. (1990). Também foi extraído o primeiro arco branquial direito, fixado em solução de Bouin por 16h, em seguida foram lavados em água corrente e armazenados em álcool 70%. Após preparação histológica das brânquias, foram avaliadas as lamelas primárias e secundárias quanto a sua morfologia, registrando a frequência de alterações histológicas descritas na literatura, tais como: hiperplasia lamelar, hipertrofia lamelar, edemas, hiperplasia interlamelar, fusões lamelares.

RESULTADOS

Com relação aos danos histológicos nas brânquias, verificou-se que a coleta do inverno apresentou maior frequência de lamelas alteradas, destacando-se o ponto de Ijuí. Na coleta do verão a frequência de lamelas alteradas foi menor nos três pontos, mas o ponto de Ijuí novamente apresentou valores superiores.

A frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares foi significativamente maior no ponto 3 (Pirapó) do que no ponto 1 (Ijuí) na coleta de inverno (neste período não foi possível analisar os peixes do ponto 2). Na coleta de verão não foram observadas diferenças entre os pontos coleta.

DISCUSSÃO

Em ambientes aquáticos degradados, particularmente quando há poluentes em concentrações subletais e crônicas, alterações da estrutura e função dos organismos aquáticos ocorrem mais frequentemente que mortalidade em massa. Por isso, na avaliação dos efeitos de poluentes em peixes de água doce devem ser consideradas as mudanças morfofisiológicas nos órgãos e tecidos, como brânquias, e moléculas, como o DNA (Santos, 2010). Na presença de poluentes, as brânquias podem exibir modificações que são consideradas respostas de defesa, visto que algumas levam ao aumento da distância entre o meio externo e o meio interno, diminuindo assim a área da superfície em contato com o poluente. Porém, a dificuldade para a difusão do

poluente para o meio interno ao mesmo tempo provoca redução na difusão dos gases respiratórios, podendo provocar hipóxia (Mallatt, 1985).

A presença em todos os pontos de coleta de edema e descolamento do epitélio das representam os primeiros sinais de alterações graves em brânquias (Tophon et al., 2003), o que sugere alteração na qualidade da água. Da mesma forma, a ocorrência de frequências elevadas de micronúcleos indica contaminação por substâncias mutagênicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados mais detalhados e conclusivos serão obtidos com o prosseguimento do monitoramento nos três locais de coleta.

REFERÊNCIAS

- Al-Sabti K; Metcalfe C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 343:121-135. 1995.
- Al-sabti, K. Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L comp. *Biochem. Physiol.* 85C, 5-9. 1986.
- Carrasco, K. R.; Tilbuty, K. L.; Myers, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 47, n. 11, p. 2123-2136. 1990.
- Claxton, L. D; Houk, V. S.; and Hugles T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluens. *Mutat Res* 10:327-243. 1998
- Grisolia C. K.,Carla L.G. Rivero, Fernando L.R.M. Starling; Izabel C.R. da Silva; Antonio C. Barbosa and Jose G. Dorea. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 1, 138-143. 2009.
- Grisolia, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research*, v. 518, p. 145-150. 2002.
- Mallatt, J., 1985. Fish Gill structural changes induced by toxicants and other irritants: Astatistical review. *Canadian of Journal Fisheries Aquatic Sciences*, Ottawa, v. 42, p. 630-648.
- Matsumoto, S. T; Mantovani, M. S; Malaguttii, M. I. A; Dias, A. L; Fonseca, I. C; Marin-Morales, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome

aberrations in on root-tips. *Genetics and Molecular Biology*. 29, (1) 148-158. 2006.

Rodriguez-Cea A., F. Ayllon, and E. Garcia-Vazquez. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56 442–448. 2003

Santos, DMS., 2010. Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão. Jaboticabal, SP. *Faculdade de ciências agrárias e veterinária-UNESP, campus de Jaboticabal, SP.*

Sperling, E. V. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. *Bio.*, 2 (3): 53-6. 1993.

Stahl Jr RG. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicol Environ Saf*; 22 (1):94-125. 1991

Thophon, S M., Kruatrachue, M., Upatham, ES., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S. and Jaritkhuan, S., 2003 Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, Barking v. 121, p. 307-320.

Tomita, R.Y; Beyruth, Z. Divulgação Técnica Toxicologia de Agrotóxicos em Ambiente Aquático. *Biológico, São Paulo*, v.64, n.2, p.135-142, jul./dez., 2002.

Udroiu, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79. 201-204. 2006.

Von, Burg R. and Liu, D. Cromium and hexavalent chromium. *J Appl Toxicol* 13:225-230. 1993.

White, P. A. e Hamussen. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.* 410:223-226. 1998.

www.fepam.rs.gov.br – Acesso em 03 de agosto de 2011.

www.profill.com.br/planoijui/bacia - Acesso em 03 de agosto de 2011.

BIOMONITORAMENTO ATIVO DA GENOTOXICIDADE DO AR EM ÁREAS COM DIFERENTES IMPACTOS ANTRÓPICOS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS DO SUL, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Karen Caon - Feevale¹
Daiane Trindade da Costa - Feevale²
Gustavo Marques da Costa - Feevale³
Mara Betânia Brizola Cassanego - Feevale⁴
Annette Droste - Feevale⁵

Palavras-chave: Poluição atmosférica. *Tradescantia pallida* var. *purpurea*. Bioindicação. Micronúcleo. Qualidade ambiental.

1. INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica tem-se tornado uma das mais graves ameaças à qualidade ambiental, sendo definida como o resultado da introdução excessiva de compostos e partículas para as camadas de ar da atmosfera. O município de Caxias do Sul, localizado no Estado do Rio Grande do Sul, possui aproximadamente 435.564 habitantes, distribuído em uma área de 1.644 km² (IBGE, 2013). A região sedia o segundo maior polo metal mecânico do país o que contribui para o aumento da urbanização e da frota veicular, causando impactos à qualidade ambiental (MAZZONI et al. 2012). O aumento de compostos e partículas na atmosfera interfere na qualidade ambiental (Savóia et al., 2009). Nesse contexto, o biomonitoramento da poluição do ar se torna um importante instrumento de avaliação, para que medidas de controle sejam adotadas (CARRERAS et al. 2009). Os bioindicadores respondem aos efeitos sinérgicos das complexas misturas químicas (ISIDORI et al. 2003), podendo ser utilizados como um parâmetro complementar para avaliar a qualidade do ar. *Tradescantia pallida* var. *purpurea* é uma espécie que vem sendo utilizada em biomonitoramento da qualidade do ar em diferentes locais (COSTA e DROSTE, 2012).

¹Mestranda em Qualidade Ambiental, Universidade Feevale. caonkaren@hotmail.com

²Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS e Bolsista de Aperfeiçoamento Científico da Universidade Feevale.

³Mestre em Qualidade Ambiental pela Universidade Feevale, Doutorando em Qualidade Ambiental na Universidade Feevale e Bolsista - CAPES/FAPERGS.

⁴Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, Doutoranda em Qualidade Ambiental na Universidade Feevale e Bolsista - CAPES/PROSUP.

⁵Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Docente e Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental da Universidade Feevale.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O ar das grandes cidades vem apresentando de forma crescente substâncias que são inóspitas ou impróprias aos organismos vivos, podendo a poluição atmosférica ser vista também como um caso de saúde pública. Estudos epidemiológicos confirmam essa visão, pois têm mostrado uma relação entre o aumento da poluição aérea em centros urbanos e o aumento de doenças respiratórias na população (HENDERSON et al., 1975; ALVES, 2001). Extratos do ar de ambientes urbanos induzem genotoxicidade não apenas em humanos, mas também em animais, plantas e bactérias, podendo comprometer a harmonia dos ecossistemas (ISIDORI et al., 2003).

As plantas fornecem dados de biomonitoramento importantes para os programas de controle da poluição do ar. Suas respostas podem ser observadas tanto em nível macroscópico, através da apresentação de cloroses, necroses, quedas de folhas ou diminuição no seu crescimento, como podem ocorrer em nível genético (ALVES, 2001). O biomonitoramento do ar atmosférico pode ser passivo, com a utilização de organismos naturalmente existentes na área avaliada, ou ativo, quando os bioindicadores são introduzidos no ambiente a ser estudado. Uma vantagem do uso do biomonitoramento ativo é a eliminação de alguns fatores, como: diferença das características do solo, suprimento de água, estágio de desenvolvimento e exposição das plantas, que podem modificar os resultados obtidos (GUIMARÃES et al., 2000).

A avaliação da qualidade do ar por meio do teste de micronúcleos em *Tradescantia* (Trad-MCN) é considerada valiosa ferramenta pela simplicidade da metodologia e sensibilidade desta planta aos agentes genotóxicos (MA et al., 1994; RODRIGUES et al., 1997; BATALHA et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2000). Micronúcleos (MCN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e, por isso, não são incluídos no núcleo das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (HEDDLE et al., 1983).

Especificamente no Brasil, diversos estudos com o uso de *Tradescantia* foram realizados na última década. Em Santo André (São Paulo), *Tradescantia pallida* var. *purpurea* foi exposta a vários locais contaminados com diferentes poluentes atmosféricos. Os autores concluíram que as condições do ambiente observadas nos locais poluídos promoveram um aumento na frequência de micronúcleos, destacando os locais poluídos com intenso tráfego veicular (SAVOIA et al., 2009).

A frequência de micronúcleos encontrada nas tétrades de *Tradescantia pallida* var. *purpurea* exposta em Estância Velha foi significativamente superior à encontrada no ambiente rural, podendo relacionar-se com a urbanização e a industrialização da localidade (COSTA e DROSTE, 2012).

Considerando a inexistência de dados sobre a qualidade do ar no município de Caxias do Sul e reconhecendo a importância do biomonitoramento ambiental como contribuição ao diagnóstico ambiental, o presente estudo tem por objetivo avaliar a qualidade do ar desta cidade, em áreas com diferentes impactos antrópicos por meio do teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida* var. *purpurea*.

3. METODOLOGIA

Foram selecionados três pontos de exposição no município de Caxias do Sul (urbano, industrial e agrícola), amostrados durante os meses de novembro de 2012, janeiro e março de 2013. Após 24 h de adaptação, as inflorescências com botões florais de *Tradescantia pallida* var. *purpurea* foram transportadas até os pontos amostrais e expostas por 8 h, em seguida foram recuperadas por 24 h em água destilada. Dez lâminas foram preparadas para cada amostra. A fixação das inflorescências, o armazenamento, a preparação das lâminas e a análise dos dados foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Thewes et al. (2011). Simultaneamente, foi realizado o controle negativo com água destilada, em sala climatizada. As frequências médias de micronúcleos obtidas nas amostras em cada mês foram comparadas utilizando o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

No mês de novembro, os botões florais expostos às áreas urbana e industrial apresentaram as maiores frequências de MCN (8,27 e 5,80, respectivamente) não diferindo significativamente entre si, porém diferindo estatisticamente daqueles expostos à área rural (2,77) e do controle negativo (1,57) ($F=17,252$; $p<0,001$), que não apresentaram diferença significativa. Em janeiro, a maior frequência de MCN foi observada nos botões expostos à área industrial (5,30), diferindo ¹significativamente dos expostos às áreas urbana (3,57) e rural (3,40). As frequências observadas nas amostras do controle diferiram daquelas obtidas nos pontos amostrais ($F=22,658$; $p<0,001$). No mês de março, os botões expostos às áreas urbana,

industrial e rural apresentaram frequências de MCN estatisticamente iguais (3,97; 3,50 e 3,43, respectivamente) e superiores àqueles do controle (1,33) ($F=9,016$; $p<0,001$).

5. DISCUSSÃO

As frequências de MCN observadas evidenciaram genotoxicidade do ar nos pontos amostrados, alertando sobre os possíveis efeitos dos poluentes atmosféricos aos organismos vivos. Os botões florais expostos na área urbana apresentaram oscilações nas frequências de MCN (8,27; 3,57 e 3,97), provavelmente pela diferença de tráfego durante o ano. Pereira et al. (2013) também encontraram diferenças nas frequências de MCN (3,25; 4,42) em ambientes com diferentes intensidades veiculares. No mês de novembro, a frequência de MCN da área rural foi menor (2,77) do que nos meses subsequentes, provavelmente por não ser época de utilização de agrotóxicos nos parreirais, que constitui a cultura predominante na região (EMATER, 2013). Os resultados obtidos na região industrial foram semelhantes nos diferentes períodos do biomonitoramento (5,8; 5,3 e 3,5), devido à presença de fontes estacionárias de poluição atmosférica no ambiente (MEIRELES et al. 2009).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentaram a presença de agentes com potencial genotóxico no ar atmosférico de Caxias do Sul ao longo de todo o período amostrado. Os dados reforçam a importância do uso do biomonitoramento ativo com o bioensaio Trad- MCN para avaliação da qualidade do ar em diferentes áreas de um município.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. S.; GIUSTI, P. M.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P. H. N.; GUIMARÃES, E. T.; LOBO, D. J. A. Estudo anatômico foliar do clone híbrido de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.4, p. 561-566, 2001.

BATALHA, J.R.F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; DEUR, T.; CARVALHO, H.A.; ALVES, E.S.; DOMINGOS, M.; RODRIGUES, G.S.; SALDIVA, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. **Mutation Research**, v.426, p. 229-232, 1999.

CARRERAS, HA., RODRIGUEZ, JH., GONZALEZ, CM., WANNAZ, ED., FERREYRA, FG., PEREZ, CA. e PIGNATA, ML. Assessment of the relationship between total suspended particles and the response of two biological indicators transplanted to an urban area in central Argentina. **Atmospheric Environment**, v.43, p. 2944-2949, 2009.

COSTA, G. M.; DROSTE, A. Genotoxicity on *Tradescantia pallida* var. *purpurea* plants exposed to urban and rural environments in the metropolitan area of Porto Alegre, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.72.4; p.801-806, 2012.

EMATER, 2013. Associação Rio-Grandense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/site/>. Acesso em: 20 jun. 2013.

GUIMARÃES, E. T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E. S.; CALDINI J. R. N.; LOBO, D. J. A.; LICHTENFELS, A. J. F. C.; SALDIVA, P. H. N. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. **Environment and Experimental Botany**, Oxford, v.44, n.1, p.1-8, 2000.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/linl.php?uf=rs>. Acesso em: 10 jan.2013.

ISIDORI, M.; FERRARA, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PARRELA, A. *In situ* monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassays and semipermeable membrane devices (SPMDs). **Chemosphere**, v.52, p. 121-126, 2003.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vitro* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v.18, p.1987-1990, 1983.

HENDERSON, B.E., GORDON, R.J., MENCK, H., SOOHOO, J., MARTIN, S.P. & PIKE, M.C. Lung cancer and air pollution in Southcentral Los Angeles country. **American Journal of Epidemiology**, v.101, p. 477- 488, 1975.

MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CHEN, R.; GILL, B. S.; SANDHU, S. S.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M. F. *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Mutation Research**, v. 310, p.221-230, 1994.

- MAZZONI, A. C.; LANZER, R.; BORDIN, J.; SCHAFFER, A.; WASUM, R.; Mosses as indicators of atmospheric metal deposition in an industrial area of southern Brazil. **Acta Bot. Bras.** 2012, v.26, n.3 p. 553-558.
- MEIRELES, J.; ROCHA, R.; NETO, A.C.; CERQUEIRA, E.. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN). **Mutation Research**, v. 675, p.46-50, 2009.
- RODRIGUES, G.S.; MA, T.H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L.H.. *Tradescantia* bioassay as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Critical Reviews of Plant Science**, v.16, p. 325-359, 1997.
- SAVOIA E. J.; DOMINGOS M.; GUIMARÃES E. T.; BRUMATI, F.; SALDIVA P.H. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo Andre, SP, Brazil, through Trad- MCN bioassay. **Ecotoxicology Environmental**, v.72, p. 255-260, 2009.
- THEWES, M. R., ENDRES JUNIOR, D., DROSTE, A. Genotoxicity biomonitoring of sewage in two municipal wastewater treatment plants using the *Tradescantia pallida* var. *purpurea* bioassay. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.4, p.689-693, 2011.

EFEITOS DA INFECÇÃO POR ADENOVÍRUS 5 SOBRE A EXPRESSÃO DE QUATRO GENES ENVOLVIDOS NO CICLO CELULAR

Isabel Cristina Giehl¹
Caroline Rigotto Borges²
Andréia Henzel³
Rodrigo Staggemeier⁴
Larissa Ferreira de Jesus⁵
Fernando Rosado Spilki⁶

Palavras-chave: Infecção por HAdV-5. Linhagem celular humana. Transcrição. qPCR.

INTRODUÇÃO

Adenovírus são vírus de DNA, não-envelopados, que pertencem à Família *Adenoviridae*. Alguns adenovirus humanos, mais especificamente o sorotipo 5 (HAdV-5) causam infecções no trato respiratório. Durante um processo de infecção, é bastante conhecida a capacidade que os AdV têm de reprogramar a célula hospedeira e burlar seus mecanismos de defesa antivirais, para que consigam reproduzir-se. Estes vírus codificam diversas proteínas que interferem em mecanismos celulares que regulam processos como a progressão do ciclo celular e a apoptose.

A fim de compreender quais são os impactos da infecção por adenovírus sobre linhagens celulares isoladas a partir de diferentes organismos, são cada vez mais frequentes estudos *in vitro* voltados para o exame desse processo de reprogramação na expressão gênica da célula hospedeira durante a infecção. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo compreender qual o impacto de uma infecção por adenovirus humano tipo 5 (HAdV-5) em uma linhagem de células humanas (A549), no que diz respeito à expressão de alguns genes envolvidos no controle do ciclo celular. Para tanto, é necessário conhecer os níveis basais da expressão destes genes em células mantidas sob condições normais, em comparação com células da mesma linhagem expostas ao AdV-5. Os intervalos de tempo analisados são 1, 24 e

¹Mestre em Genética e Biologia Molecular, Bióloga, Doutoranda em Qualidade Ambiental – Universidade Feevale.

²Doutora em Biotecnologia, Bióloga, Pesquisadora Pós-doutoral do PPG em Qualidade Ambiental – Universidade Feevale.

³Doutora em Fisiopatologia da Reprodução, M.V., Pesquisadora Pós-doutoral do PPG em Qualidade Ambiental – Universidade Feevale.

⁴Mestre em Qualidade Ambiental, Biomédico, Doutorando em Qualidade Ambiental – Universidade Feevale.

⁵Graduanda em Biomedicina, Bolsista de Iniciação Científica – Universidade Feevale.

⁶Dr. MSc. MV, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental Bolsista de Produtividade CNPq - PQ2 – Universidade Feevale.

48 horas pós-infecção. A ferramenta utilizada para a quantificar a expressão gênica é a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os AdV são vírus não-envelopados, de partícula icosaédrica constituída por um capsídeo externo que envolve um cerne de DNA genômico de fita dupla (STEWART *et al.*, 1993; LEHMBERG *et al.*, 1999). Os AdV humanos fazem parte do gênero *Mastadenovirus*, pertencente à família Adenoviridae (ICTV, 2011). Os tipos de AdV humanos mais comumente usados em pesquisa são o HAdV-2 e o HAdV-5, pertencentes ao Subgrupo C, que têm relação com doenças do trato respiratório (ainda que sejam consistentemente excretados pela via fecal) e, *a priori*, não possuem potencial oncogênico (GRANBERG, 2006).

Quando uma célula é infectada por AdV, sua expressão gênica é alterada. Inicialmente, a transcrição de genes celulares envolvidos na defesa contra o vírus é aumentada. Em seguida, grande parte dos genes celulares é silenciada e apenas aqueles que são úteis para a replicação viral têm sua expressão aumentada (DORN *et al.*, 2005). Estes vírus codificam vários genes que agem diretamente sobre algumas proteínas celulares envolvidas na regulação da transcrição (ZHAO *et al.*, 2007). Desta forma, inúmeros processos celulares são afetados durante a progressão da infecção por AdV, de forma a otimizar o ambiente celular e deixá-lo propício para a replicação viral. Dentre os processos que sofrem interferência, pode-se citar de forma generalizada o controle do ciclo celular, rotas de crescimento e inibição do crescimento celular, bem como o metabolismo de DNA, RNA e de proteínas (ZHAO *et al.*, 2003).

METODOLOGIA

Adenovirus humano tipo 5 (HAdV-5) foi inoculado sobre cultivos da linhagem celular de carcinoma pulmonar humano (A549), nas concentrações de 0,1, 1 e 5 MOI (*multiplicity of infection*). O controle negativo do estudo é representado por células cultivadas em meio de manutenção, sem a inoculação do vírus.

Nos períodos de 1h, 24h e 48h pós-infecção, o RNA total dos cultivos foi extraído com o uso de um kit comercial (PureLink[®] RNA Mini Kit) e seguido da síntese de cDNA (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit). O cDNA obtido foi usado como molde para a amplificação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), com conjuntos de iniciadores específicos para as seguintes moléculas: CCNDBP1 (*Cyclin-D1-binding protein 1*) Fw 5'- GAGACCACCGAGGAGTTTAAT -3' e Rev 5'- AGCATGGACTTGTTCACAGA AC -3', TGFBR1 (*Transforming growth factor-β receptor 1*) Fw 5'- GTTACAGTGTTCCTG

CCACC -3' e Rev 5'- AGTTTTTGAAGAGGGTGCACAT -3', DHFR (*Dihydrofolate reductase*) Fw 5'- CTGTCATGGTTGGTTCGCTA -3' e Rev 5'- AACCAAGTCTTCTTACC CATA -3' e Smurf2 (*SMAD ubiquitination regulatory factor 2*) Fw 5'- CTGACAGTACTCTG TGCAA -3' e Rev 5'- GGTCATAATGCTGATTCCAC -3'. A β -actina foi usada como gene normalizador, ou seja, como controle celular endógeno (Fw 5'- GCATGGGTCAGAAGGA TT -3' e Rev 5'- CTCATTGTAGAAGGTGTGGT -3').

Todas as amplificações foram realizadas com o kit comercial Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen). As leituras da fluorescência foram obtidas através do equipamento para PCR em tempo real MyiQ™2 Two-Color Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories), a cada ciclo de amplificação, e, posteriormente, analisadas pelo *software* iQ™5 Optical System versão 2.1. Os resultados foram expressos em valor de Ct (*cycle threshold*), conforme o número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção da técnica. Para a quantificação das mudanças na expressão gênica entre o controle negativo não infectado e os grupos infectados, foi utilizado o Método Comparativo do Ct.

RESULTADOS

A concentração viral definida como ideal para este estudo foi a de 1 MOI, uma vez que fornece uma quantidade proporcional de partículas virais para a quantidade de células usada nos experimentos, ao mesmo tempo em que não causa um impacto negativo tão rápido aos cultivos celulares, permitindo que este seja mais gradual e passível de acompanhamento.

Os resultados preliminares relativos à expressão dos genes em células infectadas (tabela 1) mostram aumentos significativos na expressão de TGFBR1 e CCNDBP1, em relação ao controle não infectado, com aumentos de 4.44 vezes e 2.33, respectivamente, em 24 hpi, e de 2.32 e 2.30, respectivamente, em 48 hpi. No tempo de 1 hpi, os aumentos na expressão destes dois genes não foram significativos.

	<i>TGFBR1</i>	<i>Smurf2</i>	<i>CCNDBP1</i>	<i>DHFR</i>
1 hpi	1,12	0,43	1,15	1,25
24 hpi	4,44	0,98	2,33	0,04
48 hpi	2,32	0,25	2,30	0,14

Tabela 1: Valores da diferença de expressão (*Fold Difference*) dos genes estudados entre células infectadas com HAdV-5 e controles não-infectados, nos tempos de 1, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi).

Já as diferenças encontradas em relação à expressão dos outros dois genes (*Smurf2* e *DHFR*) em células infectadas não foram significativas, quando comparadas aos controles.

DISCUSSÃO

O aumento encontrado na expressão da molécula codificada pelo gene CCNDBP1, em células após a infecção por HAdV-5, pode ser explicado pelo fato anteriormente comentado de que existe uma indução da resposta imune neste período. O produto gerado por este gene interage com outra proteína, conhecida como Grap2, que é uma proteína adaptadora importante na sinalização para a mobilização de células imunes. Além disso, a molécula codificada pelo gene também interage com a Ciclina D, que é um importante regulador do ciclo celular, com papel fundamental na transição entre as fases S e G1. CHELLAS-GÉRY e colaboradores (2007) trazem evidências que indicam a atuação desta proteína na supressão de tumores, onde a sua superexpressão inibe o crescimento celular e a sua depleção corresponde a proliferação. Este mesmo trabalho reforça o conceito de que a infecção de células por um microorganismo resulta em alterações na expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular. Os resultados encontrados no estudo determinam que a infecção de células HeLa por *Chlamydia* faz com que a expressão de CCNDBP1 esteja reduzida, uma vez que esta bactéria necessita que a célula esteja proliferando para se estabelecer, mecanismo contrário ao observado no ciclo infeccioso dos adenovírus humanos.

Da mesma forma, o aumento na expressão TGFBR1, molécula diretamente envolvida na rota de sinalização do TGF- β (*Transforming growth factor beta*), foi um comportamento esperado, uma vez que o efeito clássico da cascata do TGF- β consiste da ação antiproliferativa em células, bloqueando o avanço do ciclo celular. Estudos similares, como o realizado por LEONG e colaboradores (2005), com a infecção de células da linhagem Vero por coronavírus, encontram resultados semelhantes, com aumento na expressão de genes como o MADH2, que medeia a sinalização de TGF- β .

É sugestivo, portanto, que na ocasião da infecção por HAdV-5, pode ser bloqueada ou refreada a progressão do ciclo celular, havendo um direcionamento da maquinaria celular para a produção de proteínas virais. Cabe ressaltar que estes mecanismos são recorrentes quando se trata da infecção de células por diferentes tipos virais e microorganismos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é um estudo inovador, uma vez que não foram reportados trabalhos nesse sentido com os modelos aqui utilizados (AdV-5 e células A549). Os resultados mostrados são preliminares, fazendo-se necessário um estudo mais aprofundado, em intervalos de tempo menores que os explorados neste trabalho, a fim de acompanhar e compreender como se dá a expressão gênica celular ao longo das fases do ciclo infeccioso do vírus.

REFERÊNCIAS

- CHELLAS-GÉRY, B.; LINTON, C.N.; FIELDS, K.A. Human GCIP interacts with CT847, a novel *Chlamydia trachomatis* type III secretion substrate, and is degraded in a tissue-culture infection model. *Cellular Microbiology*, v. 9, n. 10, p. 2417–2430, 2007.
- DORN A. et al. Identification of specific cellular genes up-regulated late in adenovirus type 12 infection. *Journal of Virology*, v. 79, n. 4, p. 2404-2412, 2005.
- GRANBERG F. Global Profiling of Host Cell Gene Expression During Adenovirus Infection. Acta Universitatis Upsaliensis. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 195, 57 p., 2006.
- GRANBERG F. et al. Modulation of host cell gene expression during onset of the late phase of an adenovirus infection is focused on growth inhibition and cell architecture. *Virology*, v. 343, n. 2, p. 236-245, 2005.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) - <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>
- LEHMBERG E. et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the adenovirus type 5 proteome. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 732, n. 2, p. 411-423, 1999.
- LEONG, W.F. et al. Microarray and real-time RT-PCR analyses of differential human gene expression patterns induced by severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus infection of Vero cells. *Microbes and Infection*, v. 7, n. 2, 2005.
- STEWART, P.L.; FULLER, S.D.; BURNETT, R.M. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO Journal*, v. 12, n. 7, p. 2589-2599, 1993.
- ZHAO, H.; GRANBERG, F.; PETTERSSON, U. How adenovirus strives to control cellular gene expression. *Virology*, v. 363, n. 2, p. 357-375, 2007.
- ZHAO H. et al. Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *Journal of Virology*, v. 7, n. 20, p. 11006-11015, 2003.