

Lesões oxidativas no DNA de glândulas digestivas de mexilhões *Perna perna* como indicadoras de estresse ambiental

Eduardo Alves de Almeida¹
Osmar Francisco Gomes¹
Afonso Celso Dias Bainy²
Marisa Helena Gennari de Medeiros¹
Paolo Di Mascio^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo,
CP 26.077, CEP: 05513-970 – São Paulo, SP, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Santa Catarina
CEP 88040-900 – Florianópolis, SC, Brasil

E-mail: pdmascio@iq.usp.br

*Autor para correspondência

Aceito para publicação em 04/11/2003

Resumo

Neste trabalho foram avaliados os níveis de lesões oxidativas em DNA (8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, 8-oxodGuo) de glândulas digestivas de mexilhões *Perna perna* expostos a diferentes metais por 24 horas, bem como de mexilhões de cultivo e de costão. Com isso, pretendeu-se avaliar a influência de fatores abióticos não controlados na produção desta lesão em mexilhões, a qual é amplamente utilizada como indicadora de ambientes contaminados. Mexilhões expostos ao chumbo e ao cádmio por 24 horas apresentaram maiores níveis 8-oxodGuo em relação ao grupo controle, e nenhuma diferença foi observada em relação

aos animais expostos ao ferro, indicando que a contaminação por metais pode ocasionar um aumento nos níveis de 8-oxodGuo nestes organismos. Por outro lado, mexilhões de costão apresentaram níveis significativamente maiores de 8-oxodGuo em relação aos animais de cultivo, provavelmente associado a um maior estresse em função das oscilações decorrentes do batimento de ondas e os ciclos de marés. Estes dados indicam que apesar da contaminação por metais ocasionar um aumento nos níveis de 8-oxodGuo em mexilhões, fatores ambientais não controlados podem influenciar nos resultados obtidos. Assim, para que este tipo de lesão possa ser usado como um indicativo de estresse, tais como a poluição marinha por metais, deve-se ter especial atenção às condições de coleta.

Unitermos: mexilhão, *Perna perna*, 8-oxodGuo, lesão ao DNA.

Abstract

In this work, the levels of DNA damage (8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxiguanosina, 8-oxodGuo) were evaluated in digestive glands of mussels exposed to different metals for 24 hours, as well as in coastal and farmed mussels. These experiments were carried out in order to evaluate the influence of uncontrolled abiotic factors on the production of 8-oxodGuo in mussels, since such lesions are extensively used as an indication of environmental contamination. Mussels exposed to lead or cadmium showed higher levels of oxidative DNA damage compared to the control group, and no difference was observed in mussels exposed to iron, indicating that metals can increase the levels of 8-oxodGuo in these organisms. On the other hand, wild mussels showed higher levels of 8-oxodGuo than farmed mussels, probably associated with high wave incidence and tidal oscillations. This data indicates that metals can increase 8-oxodGuo levels in mussels, but it also indicates that other environmental factors are capable of provoking such increases.

Thus, for more appropriate use of DNA oxidative damage as a stress index related to the environmental contamination by pollutants such as metals, the sampling conditions should be considered, since this influences the observed results.

Key words: mussel, *Perna perna*, 8-oxodGuo, DNA damage.

Introdução

Na maior parte dos organismos aeróbicos, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$), monóxido de nitrogênio (NO) entre outros, são produzidas como produtos secundários da respiração (Davies, 1995). Além disso, uma grande produção de ERON pode ser decorrente da biotransformação de diversas classes de poluentes. Estas ERON podem causar uma série de lesões às biomoléculas tais como proteínas, ácidos graxos e DNA, causando efeitos citotóxicos e teratogênicos, podendo inclusive levar a morte celular (Timbrel, 1991).

Diversos tipos de lesões ao DNA têm sido analisados como indicativos de estresse oxidativo em animais, tais como quebras simples e/ou duplas nas fitas do DNA, e mais recentemente a oxidação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) por ERON, formando a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo, figura 1) (Kasai, 1997).

Algumas espécies reativas tais como o $O_2^{\cdot-}$ e NO, não reagem com nenhuma das bases do DNA em pH fisiológico. Entretanto, devido à alta reatividade do radical $\cdot OH$, sua reação com o DNA pode gerar diversos produtos, uma vez que este radical ataca açúcares, purinas e pirimidinas, em diversas posições. O radical $\cdot OH$ pode, por exemplo, reagir com uma 2'-desoxiguanosina nas posições 4, 5 ou 8 do anel purínico. A adição do $\cdot OH$ na posição 8 produz 8-oxodGuo (Breen e Murphy, 1995).

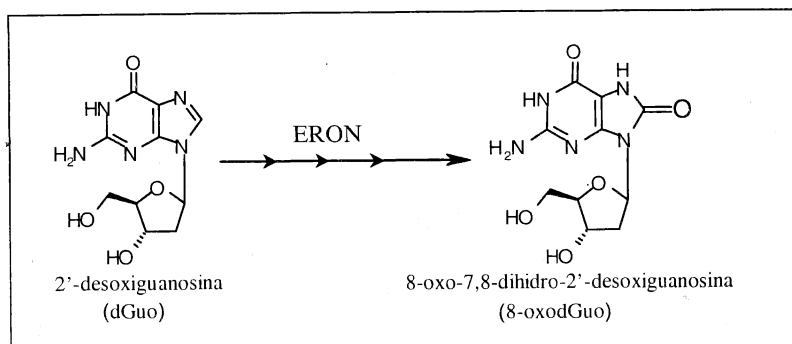


FIGURA 1: Esquema da oxidação da 2'-desoxiguanosina pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), formando a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.

Além disso, estudos *in vitro* também têm demonstrado a ação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$; estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular) sobre certas bases nitrogenadas do DNA, e mostram que essa espécie possui reatividade preferencial por resíduos de guanosina, havendo formação principalmente de 8-oxodGuo (Ravanat et al., 2001; Ravanat et al., 2002, Martinez et al., 2002).

Sabe-se hoje que os níveis de 8-oxodGuo representam de 30 a 50 % do total de modificações de bases do DNA analisadas em diferentes modelos experimentais, sendo que a presença deste dano no DNA contribui para transversões do tipo GC \rightarrow TA (Kuchino et al., 1987; Breen e Murphy, 1995).

Recentemente, o uso de biomarcadores de contaminação ambiental, ou seja, alterações biológicas a nível molecular, celular ou fisiológico, que possam expressar a exposição e os efeitos tóxicos causados pela presença de poluentes no ambiente, têm sido recomendado em estudos de diagnóstico da contaminação marinha (Burgeot et al., 1996). Dentre os biomarcadores mais comumente utilizados neste tipo de estudo, destacam-se aqueles relacionados a uma situação de estresse oxidativo, em especial

enzimas de defesa antioxidantes, danos oxidativos a membranas e mais recentemente danos oxidativos ao DNA (Livingstone, 2001).

Nesse contexto, mexilhões têm sido um dos organismos mais utilizados como organismos sentinela por apresentarem uma série de características especiais que facilitam o seu uso (Krishnakumar et al., 1997). Apesar disso, existe uma carência de informações a respeito da formação de 8-oxodGuo em DNA de invertebrados marinhos em resposta à contaminação ambiental (Livingstone, 2001; Torres et al., 2002; Almeida et al., 2003a). Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de 8-oxodGuo em glândulas digestivas de mexilhões *Perna perna* expostos por 24 horas a ferro, chumbo e cádmio. Foram também avaliados comparativamente, os níveis de 8-oxodGuo de glândulas digestivas de mexilhões de costão, em relação a mexilhões de cultivo. A partir dos resultados obtidos, pretendeu-se verificar a influência de fatores abióticos não controlados tais como oscilações dos níveis de maré e batimento de ondas na produção de 8-oxodGuo nestes organismos, uma vez que a avaliação desta lesão tem sido bastante utilizada como indicadora da contaminação marinha.

Materiais e Métodos

Experimento de exposição aos metais

Mexilhões *Perna perna* de tamanhos similares (8-12 cm) foram adquiridos de um cultivo particular localizado na praia de Sambaqui, Florianópolis, SC. Os mexilhões foram colocados em 4 aquários contendo cada um 0,5 litros de água do mar por mexilhão, a uma temperatura média de 18°C, aerados com o auxílio de dois aeradores, sendo 4 mexilhões por tanque. Após 1 dia de adaptação aos tanques, os mexilhões foram submetidos a diferentes tratamentos. O tanque 1 (grupo I), foi escolhido como grupo referência, sendo

que não foi exposto. Ao segundo, terceiro e quarto, foram adicionados sulfato de ferro II (500µg/L, de acordo com Viarengo et al., 1999), acetato de chumbo (200mg/L, de acordo com Prakash e Rao, 1995) e cloreto de cádmio (200µg/L, de acordo com Viarengo et al., 1997, e Prakash e Rao, 1995), respectivamente. Após 24 horas de exposição, os mexilhões foram retirados dos tanques e tiveram suas glândulas digestivas dissecadas, as quais foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido.

Coleta dos mexilhões de costão e de cultivo

Mexilhões *P. perna* de tamanhos similares (7-9 cm) foram coletados no costão da praia da Joaquina (n=6), e em um cultivo particular localizado na praia de Sambaqui (n=8), Florianópolis, SC, Brasil. Os mexilhões tiveram suas glândulas digestivas (GD) dissecadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido.

Extração e hidrólise do DNA

O DNA foi extraído das glândulas digestivas e hidrolizado de acordo com metodologia previamente publicada (Torres et al., 2002). Aproximadamente 500 mg de tecido foi homogenizado em 10 mL de tampão A (Sacarose 320mM, MgCl₂ 5mM, Tris HCl 10mM, desferroxamina 0,1mM, Triton x 100 1%, pH 7,5), e centrifugados a 1500 x g por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em mais 10mL do tampão A e centrifugado a 1.500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado.

Após essa primeira etapa, adicionou-se ao *pellet* coletado, 5mL de tampão B (Tris HCl 10mM, EDTA-Na₂ 1mM, Desferroxamina 0,15mM, pH 8), 180µL de SDS 10%, 150µL de RNase A (1mg/mL de tampão C - Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, desferroxamina 2,5mM, pH 7,4) e 40µL de RNase T1 (1U/µL em tampão C) e deixou-se incubando a 50°C por 30 minutos para digestão do RNA.

Posteriormente foi adicionado 150µL de proteinase K (20mg/mL de água miliQ) e as amostras foram deixadas incubando a 37°C por duas horas para hidrólise das proteínas. As amostras foram então centrifugadas a 5.000 x g por 15 minutos e ao sobrenadante adicionou-se 5mL de solução de NaI (NaI 7,6 M, Tris HCl 40mM, EDTA-Na₂ 20mM, desferroxamina 0,3mM, pH 8,0) e 10mL de isopropanol 100% para a precipitação do DNA. Em seguida, o DNA foi submetido a 2 lavagens, uma com isopropanol 60% e outra com etanol 70%, para retirada do excesso de NaI, centrifugando-se a 5.000 x g por 15 minutos em cada lavagem. Ao final, o DNA foi diluído em água MiliQ. A medida da concentração de DNA foi feita através da absorbância a 260nm (Wang et al., 1994; Helbock et al., 1998).

Para cada 200µg de DNA foi adicionado um volume de 4µL de tampão acetato 1M pH 4,8 para um volume final de 200 µL (concentração do tampão acetato 20mM). A este volume foi adicionado Nuclease P1 (10U/100ug DNA) e incubado a 37°C por 4 horas. Após este período, foi adicionado tampão Tris HCL pH7,4 e fosfatase alcalina (10U/2000mg DNA) para remoção dos grupos fosfato, incubando-se por 2 horas a 37°C (Fiala et al., 1999).

Em seguida, as amostras foram acrescidas de 1 volume de clorofórmio 100% para a precipitação de impurezas e centrifugadas a 10000 x g por 3 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi então coletada para a dosagem de 8-oxodGuo.

Medidas de 8-oxodGuo

A detecção e quantificação da 8-oxodGuo nas amostras foram feitas por HPLC acoplado a um detector eletroquímico coulométrico ESA com potenciais de 0,12 e 0,28 V para os eletrodos 1 e 2 respectivamente. O detector UV/Vis foi programado para detecção da dGuo em comprimento de onda de 254 nm. O

monitoramento dos picos tanto da 8-oxodGuo (detector eletroquímico) quanto da dGuo (detector de UV) foram feitos simultaneamente em dois canais distintos, através do software ClassLC-10, da Shimadzu. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5µm) da Supelco. A fase móvel consistia de fosfato de potássio 50 mM, 8 % metanol, com fluxo de 1 mL/min.

Análises estatísticas

Os dados obtidos expressando os níveis de 8-oxodGuo nos animais coletados foram comparados estatisticamente pelo teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA), através do *Microsoft Microcal Origin* versão 6.0. Os dados são expressos como média + desvio padrão, e apenas $P < 0,05$ foi aceito como significativo.

Resultados e Discussão

A formação de 8-oxodGuo em mexilhões *P. perna* já foi observada em resposta à contaminação marinha por esgoto doméstico, onde verificou-se que mexilhões de local contaminado (embaixo da Ponte Hercílio Luz, Florianópolis, SC) apresentaram maiores níveis desta lesão em relação a mexilhões coletados num local referência (Sambaqui, Florianópolis, SC). Discussões comparativas sobre os níveis desta lesão encontrados em diferentes tecidos de mexilhões *P. perna*, em relação a outros organismos marinhos e em relação a humanos foram feita por Almeida et al. (2003b). Neste trabalho verificou-se que apesar de os níveis de 8-oxodGuo encontrados em *P. perna* serem muito superiores aos encontrados em mamíferos, foram inferiores aos encontrados em outras espécies de moluscos e de peixes, o que poderia estar relacionado às diferentes metodologias usadas em cada trabalho, apesar de que nas comparações feitas com mamíferos, as metodologias

de extração e hidrólise de DNA, assim como de detecção das bases oxidadas foram as mesmas.

A figura 2 apresenta os dados obtidos em relação a exposição dos mexilhões aos diferentes metais. Mexilhões expostos ao ferro não apresentaram níveis diferenciados de 8-oxodGuo ($4,94 + 0,45$ 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo) em relação ao grupo controle ($6,05 + 1,70$ 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo), indicando que sob nossas condições experimentais, a exposição ao ferro por 24 horas não causou nenhum aumento nos níveis de 8-oxodGuo. Apesar de estar bem estabelecido o papel pró-oxidante do ferro em sistemas biológicos (Matos et al., 2001), a inobservância de efeitos nos níveis de 8-oxodGuo nos mexilhões poderia estar relacionada a concentração utilizada neste experimento, na qual poderia ser captado por quelantes intracelulares nos tecidos, diminuindo seus efeitos tóxicos. Desta forma, mais experimentos devem ser feitos para se verificar os efeitos de maiores concentrações deste metal na formação de 8-oxodGuo em *P. perna*.

Mexilhões expostos ao chumbo e ao cádmio apresentaram níveis significativamente maiores de 8-oxodGuo ($13,40 + 6,68$ e $9,88 + 4,87$ 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo, respectivamente) em relação ao grupo controle. Estes dados indicam que a contaminação ambiental por metais pode ocasionar um aumento nos níveis de lesões oxidativas ao DNA de mexilhões, e portanto a utilização de análises quantitativas desta lesão como um indicativo de contaminação ambiental pode ser adequada.

De acordo com esta idéia, recentemente foi demonstrado que mexilhões *P. perna* transferidos de um local limpo para um local poluído apresentaram maiores níveis de 8-oxdGuo que os animais do local referência o que poderia estar relacionado a uma possível contaminação do ambiente por metais (Almeida et al., 2003a). Da mesma forma, mexilhões de mangue da espécie *Mytella guyanensis* de ambiente potencialmente poluído também apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo, em relação a um

grupo referência, apresentando grande correlação com maiores níveis de metais pesados encontrados (Torres et al., 2002).

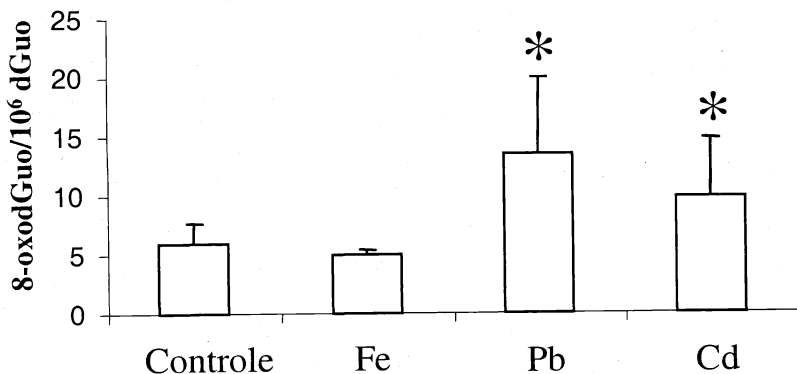


FIGURA 2: Níveis de 8-oxodGuo em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* do grupo controle e expostos a ferro (Fe), chumbo (Pb) e cádmio (Cd), por 24 horas. * indica diferença estatística ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle (N=4).

É sabido que mexilhões de costão estão diariamente sujeitos a periódicas oscilações ambientais tais como o batimento de ondas e as oscilações de maré, o que pode ocasionar grandes variações nos níveis de oxigênio dissolvido, alimento, pH e temperatura da água (Storey e Churchill, 1995). Estas condições não são vivenciadas pelos mexilhões de cultivo, que passam o tempo todo imersos na água do mar, em locais mais protegidos. Além disso, os ciclos periódicos de exposição dos mexilhões ao ar e posterior re-submersão na água do mar podem ser responsáveis por um grande aumento na produção de ERON, devido ao re-fluxo de oxigênio nos tecidos e a conseqüente oxidação de produtos ácidos do metabolismo fermentativo acumulados durante o período de exposição ao ar (Jones, 1986).

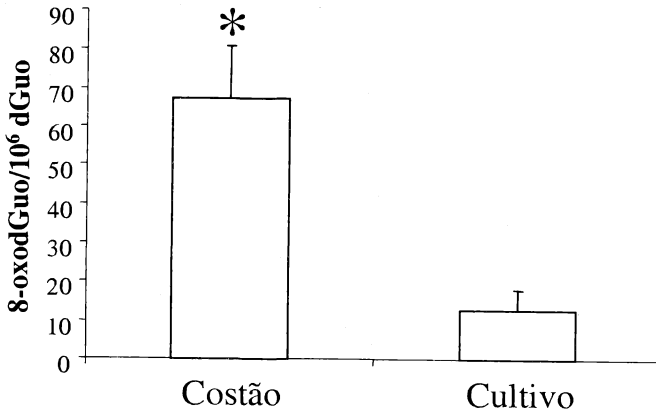


FIGURA 3: Níveis de 8-oxodGuo em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* de costão e de cultivo. * indica diferença estatística ($p < 0,05$). N = 6 - 8.

De acordo com os dados da figura 3, mexilhões de costão apresentaram níveis de 8-oxodGuo significativamente mais altos (67,40 + 13,40 8-oxodGuo/10⁶ dGuo) do que mexilhões de cultivo (12,80 + 5,40 8-oxodGuo/10⁶ dGuo), o que pode indicar uma situação de maior estresse no costão e indica que as condições de coleta podem influenciar drasticamente nos resultados obtidos em estudos de monitoramento da contaminação marinha utilizando mexilhões como organismos sentinela.

De acordo com esta idéia, foi demonstrado que mexilhões *P. perna* de costão possuem menor capacidade antioxidante que animais de cultivo, pois apresentaram menores atividades em diversas enzimas antioxidantes e complementares, tais como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione redutase e glicose 6-fosfato desidrogenase, assim como também foi observado um menor conteúdo de glutathione total nos animais de costão (comunicação pessoal).

Além disso, foi demonstrado que mexilhões mais próximos da superfície, e que por conseqüência recebem maior incidência

de luz solar do que mexilhões de maiores profundidades, apresentam maiores quantidades de quebras no DNA. Este fato poderia estar provavelmente associado a uma maior produção de espécies reativas, especialmente o $^1\text{O}_2$, por processos de fotossensibilização através da irradiação da luz solar nos tecidos dos mexilhões quando estes animais abrem suas valvas (Steinert et al., 1998).

Deve-se também levar em consideração os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho, os quais poderiam também influenciar nos resultados. Os mexilhões do experimento de exposição aos metais, foram acondicionados em tanques dentro de um laboratório, ou seja, com aeração contínua e, de certa forma, protegidos de grandes variações de temperatura e incidência luminosa. No costão rochoso, além de se tratar do ambiente natural dos animais, com todas as suas variáveis não controladas, deve-se considerar o esforço para retirada dos mexilhões firmemente presos às rochas (o que poderia causar um estresse no animal). Em ambos os experimentos, os mexilhões eram retirados um de cada vez da água e imediatamente dissecados e congelados em nitrogênio líquido, porém os diferentes ambientes dos dois experimentos devem ser levados em consideração.

Em conclusão, os dados apresentados neste trabalho indicam que poluentes como metais podem ocasionar um aumento nos níveis de 8-oxodGuo em mexilhões *P. perna*, e que por isso a avaliação desta lesão em mexilhões poderia servir como indicadora da contaminação ambiental. Apesar disso, fatores ambientais não controlados tais como batimentos de ondas e variações nos níveis de maré também podem provocar alterações nos níveis de 8-oxodGuo nestes mexilhões, o que deverá ser levado em consideração em programas de diagnóstico e/ou monitoramento da contaminação marinha.

Assim, os dados obtidos neste trabalho indicam que se deve ter especial atenção às condições de coleta dos mexilhões em

estudos de diagnóstico da contaminação ambiental onde níveis de 8-oxodGuo sejam usados como biomarcadores. Uma vez que diferentes ambientes de coleta podem resultar na obtenção de dados artefatuais. Deve-se ter o cuidado de coletar mexilhões em condições ambientais, tais como profundidade e condições climáticas, o mais semelhante possível entre os diferentes locais selecionados para o estudo.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Brasil); pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Brasil); pelo Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, PRONEX/FINEP (Brasil); e pela Pró-Reitoria de Pesquisa da USP. E.A.Almeida é aluno de doutorado, com bolsa financiada pela FAPESP .

Referências Bibliográficas

- Almeida, E. A.; Bainy, A. C. D.; Loureiro, A. P. M.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. 2003a. DNA and Lipid Damage in the Brown Mussel *Perna perna* from a Contaminated Site. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **71**: 270-275.
- Almeida, E. A.; Marques, S. A.; Klitzke, C. F.; Bainy, A. C. D.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Loureiro, A. P. M. 2003b. DNA damage levels in the digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, **135**: 295-303.
- Breen, A. P.; Murphy, J. A. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, **18** (6): 1033-1077.

Burgeot, T.; Bocquéné, G.; Porte, C.; Dimet, J.; Santella, R. M.; Garcia de La Parra, L. M.; Pffhol-Leszkowicsc, A.; Raoux, C.; Galgani, F. 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**, **131**: 125-141.

Davies, K. J. A. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society Symposium**, **61**: 1-31.

Fiala, E. S.; Conaway, C. C.; Mathis, J. E. 1999. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. **Cancer Research**, **49**: 5518-552.

Helbock, H. J.; Beckman, K. B.; Shigenaga, M. K.; Walter, P. B.; Woodal, A. A.; Yeo, H. C.; Ames, B. N. 1998. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **95**: 288-293.

Jones, D. P. 1986. Renal metabolism during normoxia, hypoxia, and ischemic injury. **Annual Reviews in Physiology**, **48**: 33-50.

Kasai, H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8OHdG, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. **Mutation Research** **387**: 147-163.

Krishnakumar, P. K.; Casillas, E.; Varanasi, U. 1997. Cytochemical responses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex exposed to microencapsulated PAHs or PCBs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **118C**: 11-18.

Kuchino, Y.; Mori, F.; Kasai, H.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E.; Nishimura, S. 1987. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and adjacent residues. **Nature**, **327**, 77-79.

Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, **42**: 656-666.

Martinez, G. R.; Ravanat, J.-L.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J.; Di Mascio, P. 2002. Naphthalene endoperoxide as a source of [¹⁸O]-labeled singlet oxygen for oxidative DNA damage studies. **Trends in Photochemistry and Photobiology**, **9**: 25-39.

Matos, H. R.; Capelozzi, V. L.; Gomes, O. F.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. G. 2001. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **396**: 171-177.

Prakash, N. T.; Rao, K. S. J. 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalves *Perna viridis* during heavy metal exposure. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **146**: 107-113.

Ravanat, J.-L.; Saint-Pierre, C.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J. 2001. Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. **Helvetica Chimica Acta**, **84**: 3702-3709.

Ravanat, J.-L.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J. 2002. Singlet Oxygen induces oxidation of cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**, **275**: 40601-40604.

Steinert, S. A.; Montee, R. S.; Sastre, M. P. 1998. Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, **1-5**: 355-358.

Storey, B. S.; Churchill, T. A. 1995. Metabolic responses to anoxia and freezing by the freeze tolerant marine mussel *Geukensia demissus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, **188**: 99-114.

Timbrel, J. A. 1991. **Principles of biochemical toxicology**. Taylor & Francis, London, England, 415pp.

Torres, M. A.; Testa, C. P.; Gáspari, C.; Masutti, M. B.; Panitz, C. M. N.; Curi-Pedrosa, R.; Almeida, E. A.; Di Mascio, P.; Filho, D. W. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, **44**: 923-932.

Viarengo, A.; Burlando, B.; Cavaletto, M.; Marchi, B.; Ponzano, E.; Blasco, J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **American Physiological Society**, **277**: R1612-R1619.

Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antartic molluscs. **Marine Environmental Research**, **44**: 69-84.

Wang, L.; Hirayasu, K.; Ishizawa, M.; Kobayashi, Y. 1994. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. **Nucleic Acids Research**, **22**: 1774-1775.