

# PADRONIZAÇÃO DO TESTE COMETA PARA ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE COMO ATIVIDADE DE ENSINO PARA GRADUAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Karine Scherer<sup>1</sup>, Andreia Aparecida Guimarães Strohschoen<sup>2</sup>

Resumo: O progresso e o desenvolvimento industrial têm como consequência a exposição do homem a uma variedade de agentes mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos, como pesticidas, aditivos alimentares, conservantes e a poluição das águas e do ar. O contato com esses agentes é responsável por causar lesões e alterações no DNA. A Genotoxicidade, setor da Genética responsável por identificar substâncias capazes de induzir a mutação, bem como avaliar quantitativamente o risco mutacional que certos agentes podem causar não só ao homem, mas também para plantas e animais, atualmente tem sido muito pesquisada. O Teste Cometa é uma técnica simples, rápida e de baixo custo para detectar e avaliar lesões pré-mutagênicas, além de auxiliar em estudos sobre biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética. O objetivo deste estudo foi padronizar o Teste Cometa para realização de análises e pesquisas de genotoxicidade. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário UNIVATES. Como resultado foi implantada a técnica, objetivo do trabalho, com a observação de núcleos de leucócitos, provenientes de sangue humano. A técnica mostrou-se adequada para a análise proposta, possibilitando a sua utilização como roteiro de aulas práticas em cursos de graduação relacionados à área da saúde.

**Palavras-chave:** Teste Cometa. Genotoxicidade. Lesão no DNA. Atividade experimental.

## 1 INTRODUÇÃO

### Molécula de DNA

Do ponto de vista bioquímico, o DNA é uma molécula bastante simples e extremamente repetitiva, em que estão contidos os genes responsáveis pelo comando da atividade celular e que permitem a transmissão das informações genéticas. Cada molécula de DNA contém vários genes dispostos de maneira linear (LEBOUTE; SILVA, 2003).

A molécula de DNA é constituída por uma sequência de nucleotídeos, formados por três diferentes tipos de moléculas: um açúcar pentose; um grupo fosfato e uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas são derivadas de compostos heterocíclicos que são as purinas, representadas pela adenina e guanina (A e G) e as pirimidinas, representadas pela citosina e timina (C e T) (KLUG et al., 2010). A quantidade total de nucleotídeos purínicos (A + G) é sempre igual à quantidade total de nucleotídeos pirimidínicos (T + C), sendo que a quantidade de A sempre igual à quantidade de T e a quantidade de G sempre igual à quantidade de C, mas a quantidade de (A + T) não é necessariamente igual à quantidade de (G + C), pois esta proporção varia entre organismos diferentes (GRIFFITHS et al., 2002).

---

1 Bióloga, Ciências Biológicas, Centro Universitário UNIVATES.

2 Orientadora. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS. Programa de Pós-graduação em Ensino de Ciências Exatas - PPGECE e PPGEnsino.

A orientação das ligações entre as três moléculas constituintes dos nucleotídeos é essencial para se determinar o sentido da dupla fita de DNA. Esta consiste de duas cadeias helicoidais, enroladas ao longo de um mesmo eixo, o que forma uma dupla hélice, com sentido rotacional à direita, estando as duas fitas de DNA em direções opostas, ou seja, são antiparalelas (LEBOUTE; SILVA, 2003). Baseados nesta estrutura demonstrou-se que todos os genes apresentam a mesma forma tridimensional e que as diferenças entre dois genes encontram-se na ordem e no número de seus quatro nucleotídeos construtores ao longo das fitas complementares (WATSON et al., 2006).

As características de hidrofobicidade das moléculas que compõem os nucleotídeos fazem com que o grupo fosfato e o açúcar (parte hidrofílica) fiquem localizados na parte externa da molécula e as bases nitrogenadas (parte hidrofóbica) fiquem localizadas na parte interna da molécula. A proximidade dessas bases possibilita a formação de pontes de hidrogênio, em que a adenina forma duas pontes de hidrogênio com a timina e a citosina forma três pontes com a guanina, resultando em um pareamento de bases específicas para cada fita, sempre uma purina ligada a uma pirimidina (LEBOUTE; SILVA, 2003).

Dessa forma, a dupla hélice é composta por duas cadeias polinucleotídicas, que se mantêm unidas por ligações não covalentes fracas entre os pares de bases, em que a adenina em uma cadeia está sempre ligada por pareamento de bases com a timina na outra cadeia e, da mesma forma, a guanina sempre realiza o pareamento de bases com a citosina. As duas fitas apresentam a mesma geometria helicoidal, mas o pareamento de bases mantém as fitas unidas com a polaridade oposta, ou seja, a extremidade 5' de uma fita realiza o pareamento de bases com a extremidade 3' da outra fita. Esta complementaridade entre a sequência das bases fornece ao DNA caráter autocodificador (WATSON et al., 2006).

A maior parte das informações genéticas em indivíduos de uma mesma espécie é semelhante, mas não idêntica, o que explica as diferenças existentes entre eles. Essas informações genéticas que variam na população são chamadas de polimorfismos (muitas formas) e ocorrem porque a estabilidade da molécula de DNA é limitada. Muitas vezes ocorrem mudanças na sequência original da molécula, o que chamamos de mutação. Diversas metodologias são empregadas com o objetivo de detectar polimorfismos, consistindo uma das etapas consiste em separar fragmentos de DNA por meio da técnica da eletroforese. Sendo empregada em diversos campos da pesquisa, a técnica consiste em separar moléculas ionizadas (proteínas ou ácidos nucleicos), de acordo com suas cargas e pesos moleculares, por meio da aplicação de um campo magnético. No caso do DNA, cada nucleotídeo apresenta um grupo fosfato com uma carga negativa e, por isso, migra em direção ao polo positivo. Dessa forma a mobilidade de uma molécula de DNA, quando submetida a um campo elétrico, irá variar praticamente de acordo com o tamanho da molécula (LEBOUTE; SILVA, 2003).

### **Genotoxicidade**

A genotoxicidade, setor da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, atualmente está sendo bastante pesquisada, pois está relacionada com malformações, doenças congênitas, doenças genéticas (mutagênese) e degenerativas, envelhecimento celular, câncer, entre outras (ERDTMANN, 2003).

A falha na separação adequada dos cromossomos durante a meiose resulta em variação no conteúdo cromossômico dos gametas, os quais possuem sítios frágeis, com regiões suscetíveis a quebras, ocasionando mutação. Esta pode ser definida como um evento que dá origem a alterações qualitativas ou quantitativas no material genético, pois o processo de mutação não é determinístico, a mutação é aleatória e as alterações no DNA podem ser de ordem molecular ou físico-química. A mutação está diretamente ligada à origem da vida e à capacidade que todas as formas de vida têm para evoluir e sobreviver (KLUG et al., 2010).

O DNA é um polímero com quatro subunidades, sendo as mesmas para todos os seres vivos. Assim, quando essa fita de DNA se rompe, processo denominado de clastogênese, a ponta livre ou é digerida pelas enzimas de restrição ou é novamente ligada com outra ponta que estiver livre, o que pode ocasionar uma recombinação genética, ou seja, uma combinação nova. Esta é a base da transgenia, que é a incorporação de DNA estranho em um conjunto organizado e funcional de material genético, ou seja, a célula. Todo DNA tem capacidade de recombinação e, se forem similares, essa probabilidade aumenta. Nos organismos mais complexos, essas recombinações estão sob o controle de um rigoroso determinismo genético, no sentido de reduzir os erros que produzem mais carga genética. Por isso, esses processos regulados geneticamente são denominados de normais, não sendo classificados como mutações, pois são processos naturais e bastante frequentes (ERDTMANN, 2003).

As mutações, convencionalmente, são classificadas em gênicas e cromossômicas. As gênicas referem-se a mudanças de uma ou poucas subunidades (nucleotídeos) do DNA por substituição, perda ou ganho dessas subunidades. Geralmente altera apenas o funcionamento do alelo de um gene, alterando seus pares de bases. Como essa mudança ocorre dentro de um único gene, sendo mapeada em um locus cromossômico (ponto), uma mutação gênica às vezes é chamada de mutação de ponto. Nas mutações cromossômicas, não há uma alteração na composição dos nucleotídeos, o que acontece são mudanças em segmentos de um cromossomo, em cromossomos inteiros ou em trechos inteiros de cromossomos, formando nova organização na estrutura dos polímeros de dupla hélice do DNA, seja por translocação, inversão ou mesmo ganho ou perda de parte maior desses cromossomos (GRIFFITHS et al., 2002).

Eventualmente, mutação gênica e cromossômica podem se sobrepor: uma translocação pode tanto destruir a estrutura de um gene como pode também alterar a regulação de genes, sem alterar a composição das subunidades do DNA por efeito de posição. Dessa forma, a translocação cromossômica é um processo de recombinação genética, só que aleatório, podendo ser desagregador e danoso, por isso que é corretamente classificado de mutacional. Dentro desse processo, também podem ocorrer eventos positivos, como duplicação gênica, aumento ou redução de cromossomos.

Para exercer a sua função de referência nos processos da vida, o DNA tem que interagir com outras moléculas, principalmente proteínas, para que possa ser copiado e duplicado, contudo cada etapa representa um risco de erro. Se ocorrer alguma mudança em uma unidade do DNA, ou seja, no nucleotídeo, isso pode determinar uma alteração no aminoácido que será incluído na cadeia que forma a proteína, resultando em um composto menos eficiente ou totalmente ineficiente, ou, ainda, produzir uma proteína mais eficiente que a original, só que, neste caso, com uma probabilidade muito pequena, quase nula, de que isso aconteça. Portanto, as mutações, mesmo sendo processos normais, constantes e rotineiros que estão diretamente ligados à vida, quase sempre são danosas, mas, ainda assim, com uma probabilidade extremamente pequena de serem vantajosas (ERDTMANN, 2003).

A justificativa da preocupação referente a uma exposição a agentes químicos ambientais é, no entanto, que esta exposição adicional representa um aumento na carga mutagênica e que todo risco em excesso precisa ser identificado e, se possível, minimizado. Em função disso, todas as espécies controlam geneticamente a taxa de suas mutações por meio de processos de reparação do DNA. Por essa razão, é importante conhecer os processos mutacionais e os fatores que os produzem, pois possibilita administrar e minorar os riscos de algum efeito indesejado (GRIFFITHS et al., 2002).

Um método eficaz para amplificação de segmentos específicos de DNA é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esse procedimento é realizado inteiramente de forma bioquímica, ou seja, *in vitro*. A PCR utiliza a enzima DNA polimerase, responsável pela síntese de DNA a partir de substratos de desoxinucleotídeos sobre um molde de DNA de fita simples. A DNA polimerase sintetiza DNA na direção 5' para 3', adicionando os nucleotídeos conforme os fragmentos do DNA

que serão copiados. A reação de PCR se repete por vários ciclos, em que cada ciclo, cada molécula de DNA é copiada e duplicada, ocorrendo um crescimento exponencial do número de cópias de DNA (WATSON, 2006).

O conhecimento da estrutura do DNA e do funcionamento bioquímico dos ácidos nucleicos e proteínas permitiram o desenvolvimento de novas tecnologias (LEBOUTE; SILVA, 2003). Uma dessas tecnologias permite o sequenciamento de genes ou de certas regiões deles para detectar uma mutação específica de doença. Como toda a sequência do genoma humano é conhecida, podem ser desenhados iniciadores da PCR para amplificar um DNA específico para sequenciamento. Uma vez que o sequenciamento do DNA é amplamente facilitado por uma quantidade abundante de DNA alvo, geralmente é necessária apenas uma aplicação de amplificação por PCR de um substrato específico de DNA para o sequenciamento (ADKISON; BROWN, 2008).

Agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando ligações covalentes com o DNA, ficando fortemente presas e, durante a replicação, acabam por não permitir a abertura das cadeias, atrapalhando a ação da DNA polimerase, resultando em deleções, alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos, a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico (PILOT; DRAGAN, 1996; MÍDIO; MARTINS, 2000).

Com o intuito de avaliar esses fatores, tem-se estabelecido normas de uso e controle de agentes potencialmente danosos, sendo realizado com base em estudos capazes de identificar substâncias que possuem potencialidades mutagênicas, carcinogênicas ou teratogênicas. A função primária dos testes de genotoxicidade é investigar, usando células ou organismos, a potencialidade dos agentes químicos de induzirem algum tipo de mutação nas células somáticas ou alterações que possam ser transmitidas às futuras gerações por meio dos gametas. Os comitês internacionais de regulamentação recomendam diferentes tipos de testes de genotoxicidade, dentre os quais alguns acabam sendo mais empregados do que os outros. Os mais utilizados são aqueles que detectam eventos mutagênicos, como: alterações moleculares (pontuais ou gênicas), pequenas deleções, recombinações mitóticas ou alterações cromossômicas detectáveis ao microscópio, que possuam baixo custo e simplicidade (SILVA; FONSECA, 2003).

A maioria dos testes genéticos busca descobrir quais agentes podem afetar o genoma, pois se um agente pode causar danos ao DNA, ele tem potencial genotóxico em qualquer outro tipo de célula (animal, vegetal ou microrganismos). Porém, diferentes organismos possuem metabolismo, mecanismos de reparação e de detoxificação, que podem variar consideravelmente, tornando a resposta dos organismos aos agentes genotóxicos diferentes. Nesse contexto, a seleção dos testes a serem utilizados para avaliação de risco é de fundamental importância para o seu sucesso. Para tanto, podem ser usadas amostras de água, solo, ar ou material biológico, produtos químicos puros ou em formulações complexas (VILLELA et al., 2003).

### **Teste Cometa**

Novas metodologias para avaliação de danos no DNA têm sido desenvolvidas. Uma das técnicas mais utilizadas para detecção de genotoxicidade tem sido o Teste Cometa, devido a sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001).

Este teste foi extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética (GONTIJO; TICE, 2003).

O Teste Cometa (teste de células individualizadas em gel de agarose) é uma técnica útil para o estudo de danos e reparos no DNA. As células com dano aumentado no DNA mostram um aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo em direção ao ânodo, que se assemelha à forma de um cometa (SPEIT; HARTMANN, 1999).

O princípio da técnica é simples: as células são inclusas em gel sobre uma lâmina de microscopia, faz-se passar uma corrente elétrica e, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda. O DNA que não estiver rompido ou quebrado fica armazenado no núcleo, sendo muito grande para migrar (SILVA et al., 2003).

O Teste Cometa é uma técnica rápida, simples e sensível, de baixo custo para mensurar, analisar as lesões, monitorar o dano e detectar efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos. Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos álcali-lábeis, crosslinks e quebras resultantes de reparo por excisão (SINGH et al., 1988; TICE, 1995; SILVA et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; PAVÃO et al., 2007). Apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, uma vez que pode ser utilizado para qualquer tipo de célula (qualquer tecido em que se possa extrair células nucleadas), sendo necessário apenas um pequeno número delas e por não necessitar de células em divisão (HARTMANN; SPEIT, 1994).

Este teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que podem ser reparadas e, se não reparadas, podem resultar em mutação. Também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, monitorando o dano, visto que as lesões detectadas por ele são passíveis de correção; embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (GONTIJO; TICE, 2003; SILVA et al., 2000; HARTMANN et al., 2003). Existem diversas evidências na literatura relacionadas à utilização do Teste Cometa. A seguir são citados alguns desses estudos.

O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o mais significativo dano oriundo do metabolismo celular. Alguns estudos têm mostrado que o cigarro pode aumentar o dano ao DNA tanto em jovens como em adultos (PIPERAKIS et al., 2003). O dano de DNA aumenta com o envelhecimento (SINGH et al., 1991). Além disso, está bem relatado que a frequência de mutações também aumenta com o envelhecimento, causado pelo acúmulo de danos e/ou pela diminuição da capacidade de reparo ao DNA (BETTI et al., 1994; McCORD; EDEAS, 2005).

O exercício físico influencia na formação de cometa, porém até o momento nenhum trabalho demonstrou alterações cromossômicas em indivíduos praticantes de exercício físico intenso (MALUF, 2004). Portanto, deve-se levar em consideração que o dano ao DNA pode ser induzido por hábitos alimentares e estilo de vida, mas que não, necessariamente, leva a mutação, pois pode ser corrigido (McCORD; EDEAS, 2005).

O Teste Cometa foi utilizado com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos genotóxicos em fumicultores, no município de Venâncio Aires – RS, tendo em vista que esses trabalhadores estão continuamente expostos a um conjunto de estressores ambientais, que podem causar efeitos severos a sua saúde, devido ao uso de pesticidas no cultivo do tabaco, bem como à manipulação das folhas de fumo molhadas. Os resultados do teste, tanto em homens quanto em mulheres, mostraram que a elevada demanda de pulverização e o uso pesado e repetido de agrotóxicos, causam danos ao DNA dos fumicultores (JUFFO et al., 2008).

Por possuírem ação genotóxica, alguns poluentes quebram a fita de DNA, ocasionando lesões genômicas que podem desencadear processos mutagênicos tanto em animais como na espécie humana. O Teste Cometa tem sido utilizado para verificar a contaminação de rios que recebem efluentes domésticos, industriais e de influência agrícola, por meio da observação de danos de DNA

em organismos bioindicadores expostos às águas poluídas. O teste é empregado para avaliar o dano de DNA em peixes que vivem nessas águas, bem como analisar a qualidade dessa água. Por isso, muitos estudos têm utilizado peixes como bioindicadores de poluição na avaliação de danos de DNA, pois eles acumulam direta e indiretamente poluentes e possuem uma resposta aos poluentes semelhante a dos mamíferos (VILCHES et al., 2008).

Geralmente, o meio aquático é afetado pelo despejo diário de efluentes oriundos de diversas indústrias, inclusive a petrolífera. O desenvolvimento de estudos para um diagnóstico atualizado dos recursos hídricos é de fundamental importância, aplicando metodologias que permitam o estabelecimento de planos de ações e de investimentos para atender as metas de qualidade. Os testes biológicos têm sido utilizados como indicadores de poluição ambiental. Em um estudo, o Teste Cometa foi utilizado para a avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. O teste foi aplicado em eritrócitos de peixes *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), expostos no laboratório a amostras de água oriundas do rio. As amostras foram coletadas em três pontos do rio: montante do despejo do efluente (P1), no local do despejo (P2) e na jusante do mesmo (P3), tendo as coletas ocorrido nos meses de maio e agosto de 2004 (estação seca) e em novembro de 2004 e janeiro de 2005 (estação chuvosa). Como controle, foi utilizada água de um poço artesiano. O teste indicou a presença de substâncias genotóxicas no rio nos pontos P2 e P3 em todos os meses da coleta, o que leva a concluir que as águas do rio Paraíba do Sul apresentaram-se comprometidas na área influenciada pela refinaria de petróleo (SOUZA; FONTANETTI, 2007).

A ethosuximida (ETX) é uma droga bloqueadora de canais de cálcio do tipo T, usada clinicamente para o tratamento de epilepsia. Foi também reportado que a ETX promoveria retardo no envelhecimento em *Caenorhabditis elegans* (verme nematodo) e aumentaria a viabilidade em linhagens de células cujo procedimento original de crescimento consistia em serem transferidas (T) a cada três dias e plaqueadas a 300.000 células por placas de petri (3T3). Com o objetivo de verificar a genotoxicidade e a clastogenicidade promovidas pela ETX em linfócitos humanos, foram cultivados linfócitos de mulheres doadoras saudáveis e não fumantes, em que, pelo Teste Cometa, pode-se observar o decréscimo em danos no DNA imediatamente após o tratamento com ETX, mostrando que a ETX não é genotóxica para as células humanas (GHIRALDINI; MELLO, 2009).

A utilização de esteroides anabolizantes com a finalidade de aumentar a massa muscular e melhorar o desempenho em competições esportivas, vem sendo feita de forma indiscriminada. No entanto, os efeitos desses esteroides sobre a saúde humana foram pouco avaliados. O Teste Cometa foi utilizado para verificar o potencial genotóxico destas substâncias em indivíduos fisiculturistas, sendo coletadas amostras de sangue periférico de 63 voluntários, dos quais 23 são praticantes do fisiculturismo não competitivo e usuários de esteroides anabolizantes; 20 fisiculturistas não são usuários de esteroides e 20 indivíduos sedentários, que não praticam exercício físico rotineiro, como grupo controle. Neste caso, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) nos vários níveis de danos no DNA entre os grupos avaliados. Dessa forma, pode-se considerar que o treinamento físico de força muscular, e o uso de esteroides anabolizantes durante o treinamento físico não induziram ao aumento de danos no DNA de leucócitos do sangue periférico (PAVÃO et al., 2007).

Em outro estudo, foram monitorados vinte farmacêuticos e enfermeiros que trabalham com a manipulação de quimioterápicos. Desses, foram coletadas seis amostras de sangue, uma na segunda-feira, manhã e tarde e as outras de terça a sexta-feira, sempre no período da tarde. Foram avaliados a genotoxicidade e o estresse oxidativo por meio dos produtos da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e das enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat). Os indivíduos pesquisados apresentaram um aumento no dano ao DNA em relação aos controles, tendo os resultados do Teste Cometa apresentado correlação positiva com os dias da semana. Quanto aos parâmetros de

estresse oxidativo, apenas a catalase apresentou aumento significativo no grupo exposto, em que foi considerada a média de todas as amostras. Porém, o TBARS mostrou um resultado interessante, levando em consideração os diferentes dias de coleta da amostra. Os expostos apresentaram uma correlação significativa com os dias da semana, com um resultado mais elevado na sexta-feira em relação ao controle e a si próprio em relação à amostra de segunda-feira de manhã.

O índice de dano no DNA dos trabalhadores pesquisados foi significativamente superior em relação aos controles, em que, nas avaliações feitas de terça a sexta-feira, os expostos apresentaram dano no DNA, sendo superior em comparação à segunda de manhã e ao grupo controle. Os resultados de dano obtidos com o Teste Cometa aumentaram do início para o fim da semana. O estudo conclui que os trabalhadores estão sujeitos aos efeitos genotóxicos provocados pela manipulação de substâncias quimioterápicas (RANDON, 2006).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo foram convidados três voluntários, universitários. O convite para participar da pesquisa e as demais explicações relativas ao desenvolvimento desta ocorreram no Laboratório de Luparia do Centro Universitário UNIVATES, sendo cada voluntário contatado individualmente. Primeiramente, o projeto de pesquisa foi enviado para o Comitê de Ética em Pesquisa (Coep), sendo aprovado via protocolo 101/2010.

Após as explicações detalhadas sobre as coletas de sangue e possíveis implicações como reações ao garroteamento, possíveis formações de hematomas ou edemas, os indivíduos voluntários que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), tendo uma via ficado com o usuário e outra com os pesquisadores. As informações fornecidas por eles por meio de um questionário não caracterizaram qualquer acréscimo de condutas. Mesmo assim, houve o manuseio de informações relativas a esses indivíduos, de modo que os pesquisadores preencheram um termo de compromisso, caracterizando o sentido científico desta pesquisa e garantindo o sigilo quanto à identidade dos sujeitos em estudo. Os questionários ficarão de posse dos pesquisadores, sendo mantidos por um período mínimo de cinco anos e após serão incinerados.

Foram incluídos na pesquisa os indivíduos maiores de 18 anos, não diabéticos (o que foi inferido pelo Hemoglicoteste (HGT) – ponta de dedo em jejum), não fumantes e não alcoólatras. Estes últimos dados foram obtidos a partir do questionário. O teste HGT e os questionários foram realizados antes da coleta do sangue venoso, a fim de permitir a inclusão do voluntário no presente estudo.

Para se submeter ao teste, que foi realizado pelos profissionais do Laboratório de Enfermagem da Univates, os indivíduos convidados a participar da pesquisa precisavam estar em jejum por pelo menos oito horas.

Após o teste HGT e o questionamento, foi coletada uma amostra de sangue periférico, aproximadamente 10 mL de cada um dos três indivíduos participantes. O sangue total de cada indivíduo foi acondicionado em tubos com anticoagulante (EDTA), envolto por papel alumínio, para evitar qualquer tipo de alteração. O Teste Cometa foi realizado com base em protocolo sugerido por Silva (SILVA, 2007).

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em geladeira a 4°C no Laboratório de Biologia Molecular, onde foi adicionada uma alíquota de 5 µL de sangue com 75 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,75%, a uma temperatura de 37°C em banho-maria e espalhadas em lâminas de microscopia pré-cobertas com agarose padrão 1%. Em seguida, estas lâminas foram cobertas com uma lamínula e armazenadas em geladeira até solidificar. Após a sua solidificação, as lamínulas

foram removidas e as lâminas colocadas em cubetas de vidro apropriadas e protegidas da luz já com solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO), onde as lâminas ficaram por duas horas. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, cobertas com tampão de eletroforese (solução A = 300 mM NaOH e solução B = 1 mM EDTA), onde ficaram em descanso por 20 minutos e protegidas da luz. Após, foi realizada eletroforese em condições alcalinas (pH >13) a 25V e uma corrente de 300 mA por 15 minutos. A corrente foi controlada pelo volume do tampão. Esta etapa foi feita com a cuba de eletroforese no gelo para manter a temperatura a 4°C e ao abrigo de luz.

Após a eletroforese, as amostras foram cobertas com o tampão TRIS (0,4 M Tris pH 7,5), para serem neutralizadas por cinco minutos. Esta etapa foi repetida três vezes, desprezando-se o tampão em cada troca. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada e colocadas para secar "overnight", em temperatura ambiente.

No dia seguinte, as lâminas foram colocadas por 10 minutos em solução fixadora (15% de ácido tricloroacético + 5% de sulfato de zinco (heptahidratado) + 5% de glicerol), sendo lavadas três vezes em água destilada. Após foram colocadas em estufa para secagem à 37°C por 1 hora e 30 minutos. Ao retirar as lâminas da estufa, elas foram hidratadas por cinco minutos em água destilada. Em seguida, as amostras foram coradas, por aproximadamente 30 minutos, em solução de coloração com prata (A + B), onde A = 5% de carbonato de sódio, e B = 0,1% de nitrato de amônia + 0,1% de nitrato de prata + 0,25% de ácido tungstosilícico + 0,15% de formaldeído, a 37°C e sob agitação até que a solução comece a escurecer.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada, sendo colocadas por cinco minutos em solução de parada (ácido acético 1% em água destilada) e, novamente lavadas três vezes em água destilada. Após este processo, as lâminas ficaram secando em temperatura ambiente e foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 40X para investigação da presença de alterações no DNA (cometas) e análise dos núcleos.

O descarte dos reagentes foi feito por meio do armazenamento em recipiente adequado, o qual foi devidamente identificado com o código gerador, data, pH final do resíduo, nome do resíduo, listagem de seus componentes majoritários e minoritários, sendo encaminhado para o Programa Interno de Separação de Resíduos da Univates (PISR), o qual é responsável por dar o destino correto a esses reagentes. O material biológico foi colocado em saco plástico branco leitoso e encaminhado para a bombona de resíduos infectantes que se encontra embaixo da passarela, entre os prédios 7 e 8, sendo recolhido pela empresa Aborgama do Brasil. Já os objetos perfurocortantes foram armazenados em caixa apropriada, sendo recolhidos pelo PISR.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se os dados obtidos pela aplicação dos questionários respondidos pelos voluntários, pode-se verificar que são do sexo feminino, com idade superior a 20 anos.

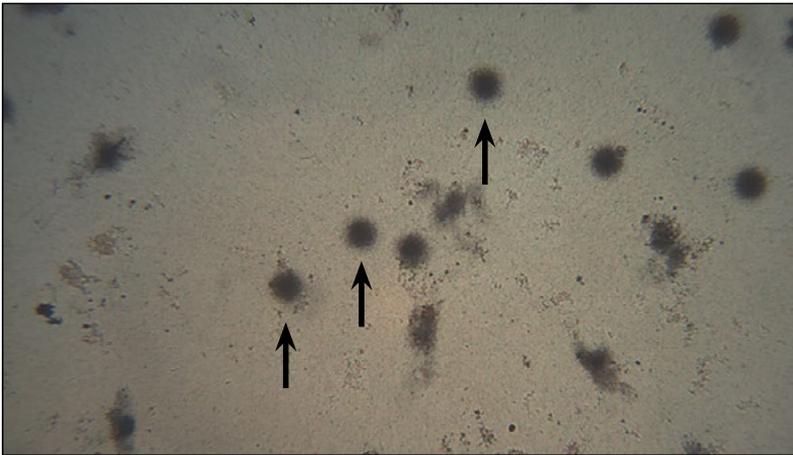
Em relação a ser ou não diabético, todos responderam que não são. No entanto, em relação à questão de apresentar parentes diabéticos, uma das voluntárias tem a avó que é portadora desta doença. A questão seguinte abordava o hábito de fumar, ao que todas responderam que não são fumantes. Sobre o uso de bebidas alcoólicas, duas voluntárias consomem uma vez por semana, enquanto uma delas ingere duas vezes por semana.

Quando questionadas sobre o conhecimento de algum outro problema de saúde, duas voluntárias responderam desconhecer algum problema de saúde, ao passo que uma delas apresenta cálculos renais. Na questão sobre a realização de Raio X, todas responderam que não se submetem a tal exame há mais de seis meses.

Pelas respostas obtidas pôde-se verificar que as voluntárias escolhidas atendiam às necessidades para contemplar o objetivo da pesquisa, ou seja, o grupo não apresentava nenhuma indicação de alterações em seu material genético, possibilitando a observação, no final da aplicação da técnica, de núcleos de leucócitos visíveis e sem aspecto de cometa.

As lâminas produzidas com a utilização da técnica foram analisadas ao microscópio óptico com aumento de 40X, observando-se a presença de núcleos conforme fotografias abaixo. A Figura 1 mostra núcleos de leucócitos intactos, sem a verificação da migração do DNA.

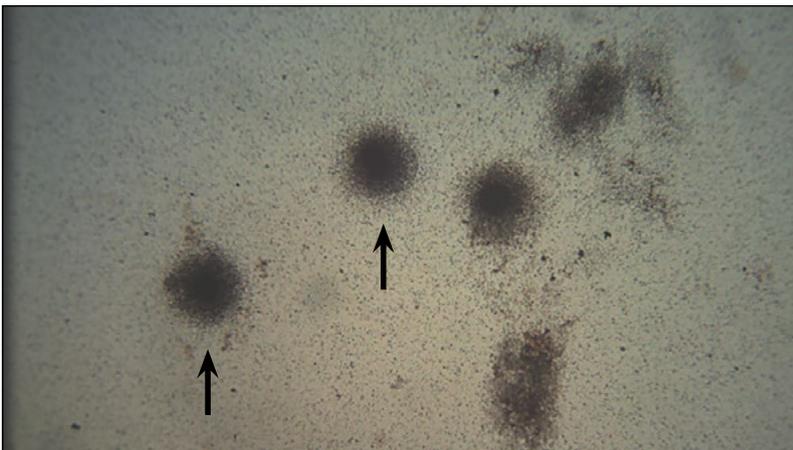
FIGURA 1: Amostra 1, contendo sangue em microscopia óptica, com aumento de 40X. Observam-se núcleos intactos sinalizados com seta



Fonte: a autora.

Para melhor visualização dos núcleos, as lâminas foram observadas no aumento de 100X. Também neste aumento é possível observar a presença de núcleos (FIGURA 2).

FIGURA 2: Amostra 1 contendo sangue em microscopia óptica, com aumento de 100X. Núcleos sinalizados com uma seta na imagem



Fonte: a autora.

Nesta segunda figura observa-se a presença de núcleos redondos, sem a cauda do cometa, portanto, sem dano.

Quando ocorre algum tipo de dano, o núcleo das células pode se apresentar com a forma de cauda de cometa, de acordo com o grau do dano (SAVI, 2004).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação aos resultados obtidos neste estudo conclui-se que a padronização do Teste Cometa foi obtida com êxito, comprovando-se que a utilização dessa técnica para observação de núcleos de células sanguíneas é eficaz, observando-se a presença de núcleos em todas as lâminas analisadas, corroborando a eficácia da técnica.

A utilização do teste para ensaios de genotoxicidade se faz de extrema importância, pois a técnica é simples, rápida e de baixo custo, podendo os resultados ser obtidos em um período de três dias.

Ressalta-se que o Teste Cometa tem sido utilizado eficazmente para detectar lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo Teste Cometa são passíveis de correção, uma vez que danos no DNA são frequentemente observados em célula e tecido específicos.

Uma metodologia como o Teste Cometa permite a detecção de dano e seu reparo em uma única célula e, conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, sendo de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos.

Visando à aplicabilidade dos resultados encontrados com o presente trabalho, objetiva-se utilizar o Teste Cometa como ferramenta para análise de danos no material genético em aulas práticas com alunos de graduação de cursos relacionados à área da saúde. Ressalta-se que se trata de uma técnica relativamente simples, de baixo custo e que não exige equipamentos tão complexos, ao mesmo tempo que permite aos alunos interagirem durante todas as etapas do processo.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Universitário UNIVATES e às professoras Adriane Pozzobon, coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular e Michele Mergener pelo auxílio bibliográfico.

#### REFERÊNCIAS

ADKISON, L. R.; BROWN, M. D. **Genética**. Série Elsevier de Formação Básica Integrada. Rio de Janeiro: Elsevier. 281 p., 2008.

BETTI, C. et al. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutation Research**. v. 307, n. 1, p. 323-33, 1994.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. *In*: Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.

GHIRALDINI, F. G.; MELLO, M. L. S. Atividade da ethosuximida sobre a genotoxicidade em linfócitos humanos. **55º Congresso Brasileiro de Genética**. 2009.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). **Mutation Research**, v. 346, p. 49-56, 1994.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. v. 18, p. 45-51, 2003.

JUFFO, D. D. et al. **Análise de genotoxicidade através do ensaio cometa em fumicultores gaúchos**. Universidade Luterana do Brasil – ULBRA. 2008.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. (2001). **A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay**. *Mutation Research*, Amsterdam. v. 498, p. 61-77, 2001.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de Genética**. 9 ed. São Paulo: Artmed, 863 p. 2010.

LEBOUTE, A. P. M.; SILVA, J. Toxicologia molecular. *In*: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.

MALUF, S. W. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clin Chim Acta**. v. 347, n. 1-2, p. 15-24, 2004.

MCCORD, J. M.; EDEAS, M. A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. **Biomed Pharmacother**. v. 59, n. 4, p.139-42, 2005.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela. 295 p. 2000.

PAVÃO, P. R. G. et al. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp**. São Paulo, Jan./Mar. v. 21, n. 1, p. 5-10, 2007.

PILOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Chemical carcinogenesis. *In*: KLAASEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 5 ed. New York: McGraw Hill. 201-267p. 1996.

PIPERAKIS, S. M. et al. Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. **Environ. Mol. Mutagen**. v. 41, n. 2, p. 104-110, 2003.

RANDON, F. R. **Avaliação dos níveis de genotoxicidade e estresse oxidativo em manipuladores de quimioterápicos em serviços de oncologia**. Universidade de Caxias do Sul – UCS. 2006.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A. Importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.; **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora ULBRA. 2003.

SAVI, L. A. **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpéticas e antioxidante de compostos fenólicos**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.

SILVA, J. **O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica**. Genética na escola. 2007.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.

SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; MARINHO, J. R. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 241-245, 2000.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. *In*: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SINGH, N. P. et al. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. **Mutat. Res.** v. 256, n. 1, p. 1-6, 1991.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experim Cell Res.** v. 175, p. 184-191, 1988.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. **Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo**. Universidade Estadual Paulista – UNESP. 2007.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Met. Mol. Biol.**, v. 113, p. 203-212, 1999.

TICE, R. R. The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. *In*: PHILLIPS, D. H.; VENITT, S. (Eds.), **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers, Oxford. p. 315-339. 1995.

VILCHES, M. et al. Análise da genotoxicidade do Rio Cadeia (RS) utilizando ensaio cometa em peixes. **54º Congresso Brasileiro de Genética**. 2008.

VILLELA, I. V. et al. Bioensaios para Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. *In*: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.

WATSON, D. J. et al. **Biologia Molecular do Gene**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.