

## CONSTRUÇÃO DE UM PROTOCOLO AUDIOVISUAL DO ENSAIO COMETA *IN VITRO*

*Kelly Louise Thiel*

*Fernanda Rabaioli da Silva*

*Juliana da Silva*

### 1 INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico, o inchaço não planejado das cidades e avanço tecnológico pós era industrial tem trazido conseqüências para o planeta. Segundo dados do Censo IBGE, em 1950 havia cerca de 18 milhões de pessoas ocupando espaços urbanos, subindo para mais de 190 milhões em 2010. Já nas zonas rurais, houve pouca variação: de 33 para 29 milhões de pessoas.

Esse movimento da zona rural para as cidades mudou as paisagens, mas acima de tudo, acarretou impacto ambiental negativo com o desmatamento, fragmentação de habitats, perda de biodiversidade e de serviços ambientais. Para atender a demanda populacional, ainda intensificamos a produção e o uso de agroquímicos, cosméticos, fármacos, desinfetantes, surfactantes, plastificantes, nanomateriais, entre tantos outros (ROZINO, 2022; SCHNEIDER, 2022).

Esses compostos, incorporados ao cotidiano humano, considerados inofensivos à saúde ambiental e seguros a humanos, passaram a serem produzidos e descartados indiscriminadamente, sofrendo interações com outros compostos orgânicos e inorgânicos presentes no meio biótico. Como tudo retorna ao meio por retroalimentação, tem-se ocasionando a bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica (ROZINO, 2022).

Como conseqüência, estudos têm demonstrado que a forma de consumo e descarte que vivemos atualmente tem trazido prejuízos que atingem todos os seres vivos, causando perdas na qualidade das águas, solo e potenciais riscos ecotoxicológicos e epidemiológicos (ROZINO, 2022; SCHNEIDER, 2022). Por isso, são necessárias pesquisas que foquem na saúde humana e ambiental. A partir delas, podemos embasar tecnologias que visem minimizar impactos oriundos da ação humana.

Atualmente, sabe-se que a exposição a xenobióticos, incluindo os produtos químicos agrícolas, compromete a integridade do genoma. Constitutivamente, os mecanismos de reparo de dano ao DNA lidam com baixos níveis de lesão genômica e minimizam os efeitos prejudiciais de tais agentes. Contudo, um aumento no dano ao DNA acima do limite, ativa múltiplas vias de sinalização que protegem contra instabilidade genômica e restringe o crescimento de células aberrantes em resposta ao estresse genotóxico (PIMENTA, et al, 2013).

Os testes *in vitro* são métodos alternativos importantes que oferecem várias vantagens sobre os métodos tradicionais *in vivo*, incluindo condições controladas do teste, alto nível de padronização, redução na variabilidade entre os experimentos, ausência de efeitos sistêmicos, baixo custo, pequena quantidade de material necessário, menor quantidade de resíduos tóxicos e redução da necessidade do uso de animais (ARAÚJO, et al., 2014). Os resultados experimentais sugerem que a análise de genotoxicidade *in vitro* pode servir como um importante indicador dos riscos de exposição ocupacional e ambiental aos agrotóxicos, por exemplo (JAMIL, et al., 2004; ÜNDEĞER; BAÇARAN, 2005; DAS, et al., 2007).

O Ensaio Cometa, então, surge como um excelente método para sistemas *in vivo* e *in vitro* para estudos

ecotoxicológicos (PROVASE, 2022). Além disso, a técnica apresenta baixo custo, rápida execução e reprodutividade, necessitando de uma pequena quantidade de células (DIPAOLLO, 2006). Entretanto, a linguagem técnica, muitas vezes disponível apenas em outros idiomas, distanciam o entendimento de estudantes de graduação da área da saúde. Por isso, o presente estudo visa diminuir essas barreiras, tornando a sua execução facilitada por meio de uma ferramenta didática, o protocolo audiovisual.

### 1.1 O uso de modelo *in vitro* e o ensaio cometa

Modelos *in vitro* são importantes nos estudos avaliativos de compostos que modificam ou danificam a estrutura genômica de diversos organismos expostos a contaminantes ambientais. Desta forma, técnicas laboratoriais são aliadas nas pesquisas de biomonitoramento humano e ambiental juntamente com as pesquisas focadas em análises dos mecanismos de dano e reparo do DNA (PROVASE, 2022).

O Ensaio Cometa, ou eletroforese em gel de célula única (SCGE, do inglês, *Single Cell Gel Eletrophoresis*) é um estudo genotoxicológico altamente sensível que, a partir da eletroforese em gel de célula única, possibilita avaliar e quantificar danos ao DNA (MEZZALIRA, et al., 2014; PROVASE, 2022). Com o teste, observa-se o núcleo celular com dano que migra pela força da eletroforese, transportando fragmentos de DNA que formam morfologia semelhante à cauda de um cometa (MEZZALIRA, et al., 2014).

Com a técnica, as células em suspensão são incorporadas em gel de agarose, passam por solução de lise, permanecendo apenas o nucleóide no gel que, durante a aplicação da eletroforese, gera a perda da estrutura compacta das fitas simples de DNA, fazendo com que o DNA danificado se mova para longe do núcleo (PROVASE, 2022). Posteriormente, a morfologia do cometa gerado é analisada com microscopia convencional e verificado o tipo de dano, que varia de 1 a 4, sendo que núcleos intactos e sem cauda indicam células sem danos detectáveis ao DNA (PROVASE, 2022).

O SCGE foi se desenvolvendo ao longo das décadas por pesquisadores a fim de aprimorar a metodologia proposta em 1978 por Rydberg e Johanson. Em 1984, Östling e Johanson incluíram a eletroforese e a alteração do pH de 12 para 9,5. Outras modificações tornaram a técnica ainda mais sensível, como o uso de enzimas, hibridização de fluorescência *in situ*, condições neutras e alcalinas (DIPAOLLO, 2006; MEZZALIRA, et al., 2014; PROVASE, 2022).

## 2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas as pesquisas em ecotoxicologia têm crescido, sendo importantes ferramentas para compreender como os compostos presentes em solos, águas, ar e alimentos podem estar comprometendo a saúde humana e ambiental. Entretanto, muitas técnicas não estão acessíveis e de fácil compreensão para pesquisadores e estudantes de graduação e pós-graduação.

Segundo dados do INEP, no Censo da Educação Superior de 2020, os cursos de graduação na área da saúde foram os mais procurados, incluindo a modalidade à distância. Destes, poucos cursos são voltados à pesquisa de bancada, gerando dúvidas na execução dos protocolos e boas práticas laboratoriais.

Neste trabalho, pretende-se contribuir na melhora da qualidade de execução da metodologia do Ensaio Cometa, tão importante internacionalmente, na avaliação de genotoxicidade de agentes sintéticos e naturais, bem como no monitoramento da saúde humana e ambiental.

### 3 OBJETIVO

Com esse estudo objetiva-se a criação de um produto técnico, constituído pelo protocolo audiovisual do Ensaio Cometa que poderá ser aplicado com qualquer linhagem celular, tornando a sua execução fácil e correta reprodução. Desta forma, o produto poderá fornecer apoio visual em aulas práticas e em testes laboratoriais, melhorando o aproveitamento de tempo e de recursos dos laboratórios. Além disso, com o estabelecimento de metodologia clara, irá auxiliar em pesquisas científicas comparáveis.

### 4 METODOLOGIA

As filmagens realizadas no Laboratório de Genética Toxicológica da Ulbra Canoas/RS deram enfoque em cada etapa do protocolo de execução do Ensaio Cometa. Os vídeos e imagens geradas foram adaptados de modo a identificar a metodologia do teste passo-a-passo. As legendas foram elaboradas visando o caráter educativo de forma didática a fim de padronizar o protocolo.

Os materiais utilizados foram: luvas, lâminas e lamínulas, agarose, solução de lise, cubetas, ponteiros e eppendorfs, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, solução tampão, solução de fixação, banho-maria digital, geladeira, cuba de eletroforose.

### 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo audiovisual será veiculado no canal do Youtube da Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental - Mutagen Brasil. Espera-se poder contribuir com a execução prática do protocolo do Ensaio Cometa.

Produtos como esses são importantes para auxiliar na melhora da qualidade de execução de metodologias, tão importantes nacional e internacionalmente, na avaliação de genotoxicidade de agentes sintéticos e naturais, bem como no monitoramento da saúde humana e ambiental.

### REFERÊNCIAS

ARAÚJO G. L. D.; CAMPOS M. A. A.; VALENTE M. A. S.; SILVA S. C. T.; FRANCA F. D.; CHAVES M. M.; TAGLIATI C. A. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Braz. J. Pharm. Sci**, n. 50, p. 55-62, 2014.

CENSO 2010. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/administracao-publica-e-participacao-politica/9662-censo-demografico-2010.html?edicao=9673&t=destaques>>.

DAS P. P.; SHAIK A. P.; JAMIL K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: *in-vitro* studies on human peripheral blood lymphocytes. **Toxicol. Ind. Health**, n. 23, p. 449-458, 2007

DI PAOLO, C. Aplicação do ensaio cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (POEY, 1860), expostos à β-naftoflavona. **Dissertação** (Mestrado em Ciências). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

INEP. **Censo da Educação Superior**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inep/pt-br/areas-deatuacao/pesquisas-estatisticas-e-indicadores/censo-da-educacao-superior/resultados>>.

JAMIL K.; SHAIK A. P.; MAHBOOB M.; KRISHNA D. Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyriphos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes *in-vitro*. **Drug Chem. Toxicol.** n. 27, p. 133–144, 2004.

MEZZALIRA, B; FUNCHAL, C.; DANI, C. Ensaio cometa: avaliação da atividade dos calcogênios. **Revista Ciência em Movimento**, ano XVI, n. 33, ano 2014.

PIMENTA, V. S. C. Papel da proteína P53 na proliferação neoplásica. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v. 9, n. 17, p. 2013, 1992.

PROVASE, M. Análise genotóxica do Fipronil ® no cérebro de abelhas da espécie *Bombus atratus* (Hymenoptera, Bombini). **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental). Centro de Ciências e Tecnologia para a sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 2022.

PROTOCOLO ENSAIO COMETA. **Laboratório de Genética Toxicológica**, ULBRA CANOAS, versão 001.

ROZINO, L. O. Interferentes endócrinos em corpos d'água continentais brasileiros: uma revisão sobre abordagens ecotoxicológicas. **TCC** (Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2022.

SANTOS, R. A. dos.; GOULART, M. O.; PIRES, L. M.; ANDRADADE, V. M. de. Ensaio Cometa. **Da toxicogenética a toxigenômica**. Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental, Ed. Atheneu, 2021. p.117-138

SCHNEIDER, S. I. Caracterização de contraminantes ambientais emergentes e indicadores de potabilidade da água de consumo humano. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Maria. Frederico Westphalen, 2022.

ÜNDEĞER Ü.; BAÇARAN N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. **Arch. Toxicol.** n. 79, p. 169–176, 2005.