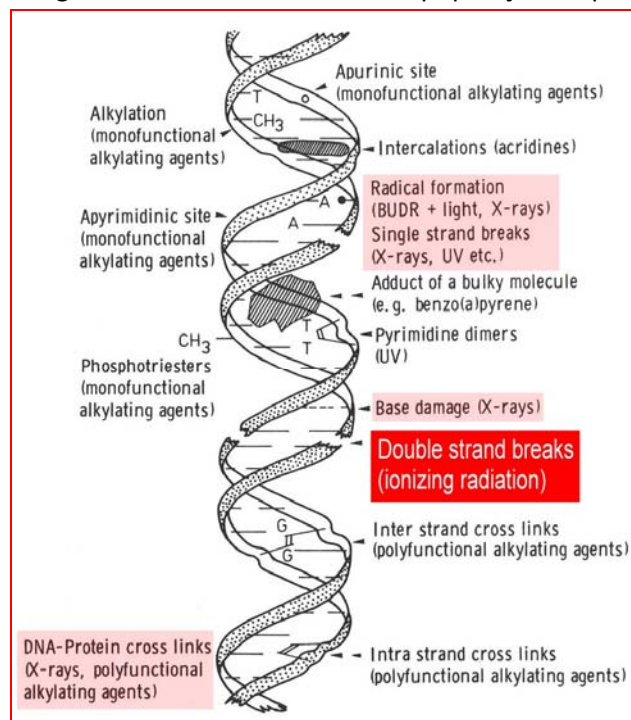


1. Ensaio de Genotoxicidade

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função e quando essas alterações se fixam de forma capaz de serem transmitidas, denominam-se mutações. As mutações são a fonte de variabilidade genética de uma população, sendo portanto fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar doenças tanto nos indivíduos como nos seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo e local onde ocorrem e alterar o balanço dos ecossistemas. Nas populações, podem aumentar a incidência de câncer, doenças hereditárias e do coração, bem como aumentar a virulência de patógenos.

Os compostos mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas (água, solo, ar); são transferidos e acumulados através das cadeias tróficas, podendo causar danos genéticos ou efeitos genotóxicos nos indivíduos ou populações expostas



Lesões no DNA cromossômico após tratamento com agentes mutagênicos

Obe & Natarajan, 1982

1.1. Salmonella/microsoma (Teste de Ames)

1.1.1 Histórico

Historicamente, a descoberta feita por Auerbach, em 1941, de que o gás mostarda provocava mutações em *Drosophila melanogaster* foi a primeira demonstração de mutagênese química induzida. Apesar da implicação desta descoberta na área da saúde humana, a maioria dos geneticistas entre 1940 e 1950 estava interessada em usar os mutágenos químicos como ferramenta para entender melhor os processos genéticos e celulares.

A preocupação com a exposição humana aos mutágenos químicos somente se

iniciou nos anos 60, devido ao avanço industrial pós-guerra, que fez com que houvesse a necessidade de se controlar a enorme quantidade de produtos lançados no ambiente. Inicialmente, foi dada maior atenção ao efeito das mutações nas células germinativas, capazes de causar doenças hereditárias. Nessa época, vários ensaios de mutagenicidade *in vivo* foram desenvolvidos. Porém, apesar da teoria da mutação somática do câncer ter sido formulada muitos anos antes por Boveri em 1914, não havia experimentos que associassem definitivamente mutágenos químicos ao processo de carcinogênese.

Essa teoria foi retomada quando o Dr. Bruce Ames e colaboradores da Universidade de Berkeley, Califórnia (Ames *et al*, 1973, 1975) desenvolveram um teste *in vitro*, de curta duração, que combinado a um sistema de metabolização *in vitro* (fração S9) desenvolvido por Malling em 1971, mostrou uma alta correlação entre vários mutágenos e carcinógenos conhecidos. Este ensaio é conhecido hoje como Teste de Ames e é considerado um marco na história da Genética Toxicológica.

1.1.2 *Salmonella*/microssoma - Princípio do método

O ensaio *Salmonella*/microssoma, conhecido como teste de Ames, é o mais utilizado atualmente e o único validado em larga escala por diversos laboratórios no mundo todo. O teste emprega linhagens de *S. Typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (*his*⁻), especialmente construídas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a síntese deste aminoácido.

A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico. O teste é feito com e sem ativação metabólica.

As diversas linhagens de *S. Typhimurium* que foram desenvolvidas pelo Dr. Bruce Ames, do Departamento de Bioquímica da Universidade da Califórnia, Berkeley, CA, U.S.A., possuem mutações para histidina em diferentes genes do operon responsável pela biossíntese desse aminoácido e apresentam também outras características genéticas que lhes conferem maior sensibilidade e versatilidade na detecção de diversos tipos de mutágenos, tais como: mutação *rfa*, deleção *uvrB* e a presença do plasmídeo pKM101. As linhagens mais comumente utilizadas pela maioria dos autores são a TA98 e TA100, principalmente em estudos de triagem, pois elas têm se mostrado eficientes na detecção de um grande número de mutágenos.

Além da vasta base de dados existente, que nos permite comparar a contribuição de fontes específicas para a genotoxicidade de uma dada mistura complexa com dados obtidos no mundo inteiro, o teste de

Salmonella/microsoma ainda nos dá idéia de que grupamentos químicos podem ser responsáveis pelo efeito que se observa, pois as respostas das diferentes linhagens, na presença e ausência de ativação metabólica são características de um ou outro grupo químico. Ainda há a possibilidade de realizar, nas amostras ambientais, procedimentos de extração orgânica preferenciais para diferentes classes de compostos, permitindo melhor direcionamento das análises químicas. Estas características e a flexibilidade do ensaio de *Salmonella*/microsoma fazem dele a nossa escolha para uso rotineiro, como excelente ferramenta de monitoramento, que nos permite triar locais de interesse e auxiliar nas ações de fiscalização e controle de poluição.

1.1.3 Preparo de amostras ambientais



Os compostos químicos podem ser testados diretamente ou dissolvidos em solventes apropriados, como por exemplo água destilada ou dimetilsulfóxido (DMSO).

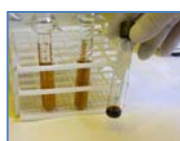
As amostras ambientais líquidas como água bruta, tratada e efluentes podem ser testadas diretamente após esterilização por membrana filtrante, porém são mais usualmente submetidas a processos de concentração e extração orgânica.

Existem vários métodos de extração orgânica, cada um sendo preferencial para determinados grupos de substâncias químicas, devendo-se, portanto, escolher o método mais apropriado para o tipo de amostra a ser analisada. Recomenda-se o uso de extração por resinas tipo XAD₂ ou XAD₄ para água bruta e tratada. Efluentes industriais, cujo conteúdo orgânico normalmente é mais elevado, podem ser testados diretamente, ou após extração líquido-líquido, ou ainda em resinas XAD.

As amostras ambientais sólidas e de material particulado de ar, podem ser extraídas através de ultrasonicação ou "soxhlet" com solventes apropriados ou lixiviados com água destilada.



Os extratos orgânicos obtidos pelos processos



acima são ressuspensos em pequenos volumes de dimetilsulfóxido (DMSO) e então testados frente às linhagens selecionadas, de forma a obter-se as concentrações de exposição desejadas.

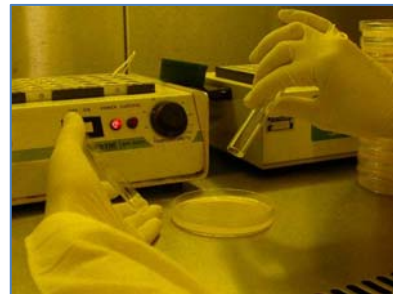
1.1.4 *Salmonella*/microsoma - variações do método

1.1.4.1 Incorporação em placas – Teste de Ames

Para o método de incorporação em placas, a amostra é misturada a 0,1 mL de cultura pernoite de bactéria e a 3 mL de ágar de superfície, estabilizado a 45°C. Para o teste com ativação metabólica, adiciona-se também 0,5 mL da mistura S9 ao "top agar".

O conteúdo de cada tubo deve ser homogêneo e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo com traços de histidina e biotina. Após solidificação do "top agar", as placas são incubadas invertidas, por 48-66 horas, a 37°C. Proceda-se então a contagem do número de revertentes por placa. O ensaio deve ser realizado em triplicata.

Para o método de pré-incubação, a amostra é misturada com as bactérias na presença ou não da mistura S9 durante 20 a 30 minutos, seguindo-se o plaqueamento em ágar mínimo. Esse procedimento é especialmente indicado para amostras com compostos apolares que não se difundem bem nas placas de ágar, principalmente amostras oleosas.



Referências básicas: Maron & Ames, 1983 e Mortelmans & Zeiger, 2000

1.1.4.2 Ensaio em microsuspenção – Teste de Kado

O teste de Kado, também denominado ensaio em microsuspenção, se baseia no aumento da quantidade de bactérias utilizadas no ensaio e na redução da quantidade de amostra e mistura S9, aumentando assim a sensibilidade do teste.

O teste emprega as mesmas linhagens de *S. Typhimurium* do teste de Ames e baseia-se no mesmo princípio. Ele é feito sempre pelo método de pré-incubação e após concentração da cultura num fator de 5X através de centrifugação, volumes de 50uL são misturados a 2uL de

amostra e a 50uL de mistura S9 (ou tampão fosfato), incubados por 90 minutos a 37°C. Após esse período, adiciona-se ágar de superfície e verte-se em placas de ágar mínimo com biotina e traços de histidina.

A partir daí todo procedimento é o mesmo descrito para o teste de Ames. Valores de taxa de reversão espontânea ligeiramente mais altos podem ocorrer, não prejudicando, no entanto, a confiabilidade do ensaio.

Referências básicas: Kado *et al*, 1983 e 1987



1.1.4.3 Método Direto

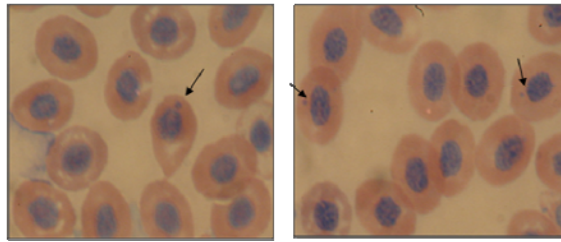
O método direto é uma modificação do teste de Ames descrito pelo CORIELL INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH (1986), que permite testar 2 mL de amostra como volume máximo, ao invés de 0,2 mL do ensaio tradicional. Esta modificação consiste na utilização de ágar de superfície mais concentrado. Esse método é aplicado para amostras ambientais líquidas, sem concentração, principalmente nos casos de efluentes industriais e lixiviados. A amostra deve ser filtrada em membranas 0,45m e/ou 0,22m para sua adequada esterilização. Algumas propriedades da amostra podem dificultar a aplicação desse método. O pH e a força iônica da amostra podem ser tóxicos para as bactérias.

1.2 Micronúcleos

1.2.1 Definição

As consequências possíveis da presença de agentes genotóxicos no ambiente pode ser avaliada por meio do estudo de danos genéticos em organismos sentinela. Mexilhões, animais bentônicos, ouriços, esponjas, anfíbios e peixes são alguns dos exemplos de organismos que têm sido utilizados para monitorar a poluição em ambientes aquáticos.

As técnicas citogenéticas têm sido comumente utilizadas para determinação dos efeitos causados por agentes genotóxicos presentes no ambiente no DNA



de organismos expostos. São procedimentos relativamente simples que podem ser feitos com amostras de órgãos ou tecidos destes organismos coletados no ambiente a ser avaliado, ou pode-se testar as

amostras do ambiente em animais criados no laboratório. Para estudos *in vitro* as células em cultura são a ferramenta utilizada.

Os micronúcleos resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou que se atrasaram em relação aos demais em sua migração em direção aos polos do fuso mitótico. Podem ser induzidos por agentes que são capazes de quebrar o DNA ou de interferir com a formação do fuso.

Referências básicas:

1.2.2. Micronúcleo em eritrócitos de peixes

No ambiente aquático, os peixes são considerados bons monitores biológicos por participarem em diferentes níveis da cadeia trófica.

Os animais são coletados em redes de pesca, vivos, anestesiados e uma amostra de sangue é retirada por meio de punção caudal. Os organismos são devolvidos ao ambiente natural e são feitas extensões sanguíneas (esfregaços) no local ou no laboratório. As células são fixadas com metanol e coradas com Giemsa. São analisadas 4000 células por organismo e o resultado é expresso em frequência de micronúcleos/1000 células.



1.3 Ensaio Cometa (SGC – Single cell gell assay)

1.3.1 Princípio do método

O Ensaio Cometa, ou “Single Cell Gel assay”, permite a obtenção de grande quantidade de dados em células individuais, necessita de um número

extremamente pequeno de células (<10.000), tem grande sensibilidade e pode ser realizado virtualmente com qualquer tipo de célula de eucarioto. Neste ensaio, as células são aplicadas em um gel de agarose sobre uma lâmina de microscópio e a seguir lisadas e submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino. A presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos e crosslinks resultantes da ação de compostos genotóxicos, altera a estrutura do DNA das células, que normalmente está superenrolado e fortemente compactado,



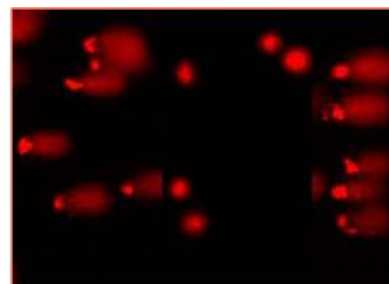
causando relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao anodo. Desta forma, após aplicação de corantes específicos, pode-se visualizar em microscópio de fluorescência a migração do DNA, que se assemelha a um cometa.

A capacidade que o DNA tem de migrar é função tanto do tamanho da molécula como da quantidade de extremidades livres (quebras, por exemplo) que, mesmo ligadas a segmentos maiores, migram numa distância pequena do corpo do cometa. O tamanho da cauda inicialmente aumenta proporcionalmente à quantidade de danos, mas a migração máxima é determinada pelas condições da eletroforese, não o tamanho dos fragmentos. A intensidade da fluorescência na cauda em relação àquela do corpo do cometa fornece informações sobre a quantidade de quebras no DNA. Assim, pode-se avaliar o dano genético tanto através da medida do comprimento da cauda do cometa, como através da quantidade de DNA presente, sendo ambos função das doses de exposição

Referências básicas: Singh *et al.*, 1988; Fairbain *et al.*, 1995, Tice, 1995.

1.3.2 Cometa em sangue de peixes

Os animais são coletados em redes de pesca, vivos, anestesiados e uma amostra de sangue é retirada por meio de punção caudal. Os organismos são devolvidos ao ambiente natural e o sangue coletado é levado ao laboratório.



Sobre uma lâmina de microscópio previamente coberta com uma camada de agarose normal (1,5%), acrescenta-se uma camada de agarose de baixo ponto de fusão (low melting point) misturada com uma alíquota do sangue coletado. O material é posteriormente lisado e as lâminas mergulhadas em tampão de eletroforese alcalino, o que permite a desespiralização do DNA. O material genético é submetido a uma eletroforese

(25V, 300mA, 20 minutos), após o que é neutralizado e fixado com etanol. As lâminas são coradas com solução de brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência. São avaliadas 100 células por organismo.