

O USO DO ENSAIO COMETA PARA O ENSINO DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA

JULIANA DA SILVA
juliana.silva@ulbra.br

Laboratório de Genética Toxicológica, PPGEICIM & PPGGTA, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Av. Farroupilha 8001, Prédio 14, Sala 230, Bairro São José, CEP 92420-280, Canoas-RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

O Ensaio Cometa (EC), “Single Cell Gel Electrophoresis”, é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão. As células, englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples. Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes no DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, crosslinks, sítios de reparo por excisão e/ou lesões alcali-lábeis.

A identificação do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras como, por exemplo, medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou ainda classificar visualmente, em diferentes níveis de dano, as células analisadas, podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células.

O Ensaio Cometa é utilizado amplamente na genética médica, genética toxicológica ecotoxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, medicina ambiental, ocupacional, biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações. A proposta deste trabalho é ensinar, de

forma simples, essa metodologia que vem sendo utilizada para o ensino de Genética Toxicológica.

MATERIAL E MÉTODOS

SOLUÇÕES

1. PBS (10X) = PHOSPHATE BUFFER SOLUTION / pH 7,4

80,0 g de NaCl + 2,0 g KCl + 21,7 g Na₂HPO₄ . 7 H₂O + 2,0 g KH₂PO₄
Completar, para 1 litro, com água destilada.
Solução uso: diluir 10X e ajustar o pH para 7,4 (NaOH ou HCl).
Guardar na geladeira.

2. SOLUÇÃO DE LISE

146,1 g NaCl (2,5 M) + 37,2 g EDTA (100mM) + 1,2 g de TRIS (10mM)
Completar, para 1 litro, com água destilada.
Acertar o pH com NaOH entre 10 e 10,5.
Guardar em temperatura ambiente.
Solução uso: No momento do uso, adicionar 1 % Triton X-100 + 10 % DMSO e colocar na geladeira.

3. TAMPÃO PARA ELETROFORESE (300mM NaOH/1mMEDTA) / pH >13

A = 200g de NaOH + 500 ml água destilada.
B = 14,89 g de EDTA + 200 ml de água destilada.
Manter as duas soluções em temperatura ambiente.
Solução uso (momento do uso): 30 ml da solução A + 5 ml da solução B.
Completar, para 1 litro, com água destilada e colocar na geladeira

IMPORTANTE: o volume total depende do tamanho da cuba.

4. TAMPÃO NEUTRALIZADOR (NH₂ . C(CH₂OH)₃) / pH 7,5

48,5 g TRIS + completar, para 1 litro, com água destilada.

Acertar pH com HCl.

5. AGAROSE 1,5 % (PRÉ-COBERTURA DAS LÂMINAS)

1,80 g agarose (normal) + 120 ml de PBS (pH 7,4)

Ferver (até borbulhar) em forno microondas (2 X)

Guardar na geladeira – tampado.

6. AGAROSE “LOW MELTING” 0,75% (PARA USO COM AS CÉLULAS)

0,15g + 20 ml PBS (pH 7,4)

Ferver (até borbulhar) em forno microondas (2 X).

Guardar na geladeira – tampado.

7. SOLUÇÃO FIXADORA (PARA COLORAÇÃO COM PRATA)

15% ácido tricloroacético + 5% sulfato de zinco (heptahidratado) + 5% glicerol

Completar, para 1 litro, com água destilada. Manter em temperatura ambiente.

8. SOLUÇÕES DE COLORAÇÃO COM PRATA

A= 5 % carbonato de sódio (em água destilada).

B= 0,1% nitrato de amônia + 0,1 % de nitrato de prata + 0,25% de ácido tungstosilícico + 0,15% de formaldeído.

Solução uso (preparar na hora do uso): 66 ml de A + 34 ml de B.

9. SOLUÇÃO STOP DE COLORAÇÃO

1% ácido acético (em água destilada).

PREPARO DAS LÂMINAS

1. Ferver a agarose 1,5 % em frasco onde caiba a lâmina. Mergulhar as lâminas, deixando a extremidade fosca de fora. Escorrer e deixá-las secar à temperatura ambiente. Estas podem ser prepa-

radas antes e armazenadas na geladeira, umas sobre as outras – manter secas;

2. Ferver a agarose “low melting” e colocar em banho 37°C;
3. Misturar 5 µl de sangue (coletado com heparina - liquemine) com 75 µl de agarose low melting;
4. Colocar imediatamente sobre a lâmina com pré-cobertura e sobre esta camada uma laminula (grande), fazendo com que esta se espalhe. Deixar na geladeira até solidificar;
5. Retirar a laminula e dispor as lâminas em cubeta de vidro vertical, já com a solução de lise gelada e protegida da luz (pelo menos 1 h em sol. de lise);
6. Colocar as lâminas em cuba horizontal de eletroforese, verter o tampão de eletroforese sobre estas, deixar descansando por 20 min;
7. Iniciar eletroforese: 25V e 300 mA por 15 min (corrente controlada com o volume do tampão);
8. Retirar as lâminas e neutralizar com o tampão TRIS, cobrir as lâminas com este tampão, esperar 5 min (repetir 3 X);
9. Lavar 2 vezes com água destilada;
10. Secar as lâminas, durante 1h30 a 2h00, a 37°C (ou Over Night);
11. 10 min em solução fixadora;
12. lavar 3 vezes com água destilada;
13. Secar as lâminas, durante 1h30 a 2h00, a 37°C (ou Over Night);
14. hidratar as lâminas, por 5 min, com água destilada;
15. corar por, aproximadamente, 15 min na solução de coloração (A+B) a 37°C (até a solução começar a escurecer);
16. lavar 3 vezes com água destilada;
17. deixar por 5 min em solução “stop”;
18. lavar 3 vezes com água destilada;
19. secar à temperatura ambiente;
20. observar ao microscópio - classificando conforme forma e tamanho da cauda (Figura 1).

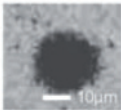
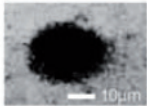
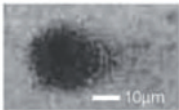
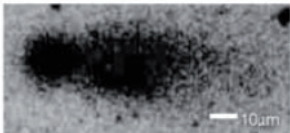
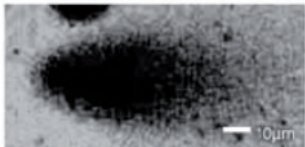
CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização desse material em sala de aula (Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Luterana do Brasil) revelou a eficiência do mesmo para a compreensão do conceito de mutagenese ambiental. Quando utilizada esta técnica com amostras sanguíneas dos alunos, coletadas antes e depois de uma atividade física, os alunos conseguem observar que o próprio oxigênio pode causar lesões no DNA. Assim, observa-se que a compreensão do conceito de mutagenese melhora muito e que há uma diminuição de equívocos a respeito do mesmo.

REFERÊNCIAS SUGERIDAS

- Betti, C., T. Davini, L. Giannessi, N. Loprieno & R. Barale (1995) Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutation Research* 343: 201-207.
- Cotelle, S. & Férard, J.F. (1999) Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 246-255.
- Fairbairn, D.W., P.L. Olive & K.L. O'Neill (1995) The Comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339: 37-59.
- Mckelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo & A. Collins (1993) The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. *Mutation Research* 288: 47-63.
- Da Silva, J., Erdtmann, B. & Henriques, J.A.P. (2003) *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcanace, v.1. 424p.
- Da Silva, J.; Freitas, T.R.O.; Marinho, J.R.; Speit, G.; Erdtmann, B. (2000) Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental in vivo biomonitoring with native rodents. *Genetics and Mol. Biol.* 23: 241-245.
- Da Silva, J.; Freitas, T.R.O.; Heuser, V.; Marinho, J.R.; Bittencourt, F.; Cerski, C.T.; Kliemann, L.; Erdtmann, B. (2000) Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutation Research* 470: 39-51.
- Tice R.R., Agurell E., Anerson D., Burlinson, B., Hartemann A, Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35 (3) 206-21.
- Villela, I. V., Oliveira, I.M., Silva, J., Henriques, J.A. (2006) DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research* 605:78-86.

Figura 1. Tabela para classificação das imagens das “células cometa” observadas (Adaptado de Villela et al., 2006).

Imagem Observada	Cauda/Cabeça	Classes de Danos
	sem cauda	0
	≤ 1	1
	1 – 2	2
	≥ 2	3
	sem cabeça	4