

Marcilene Alves Machado de Oliveira<sup>1</sup> (aperfeiçoamento I – INCA); Paula Baptista<sup>1</sup>; Júlia Alves<sup>1</sup>; Thainá Palhaes<sup>1</sup>; Juliana Gomes<sup>1</sup>; Bárbara Geraldino<sup>1</sup>; Ubirani Otero<sup>1</sup>; Márcia Sarpa Mello<sup>2</sup>; Kátia Poça.<sup>1</sup>

1. Unidade Técnica da Exposição Ambiental, Ocupacional e Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Instituto Nacional de Câncer (CONPREV/INCA);  
2. Departamento de Bioquímica, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

## INTRODUÇÃO

O Ensaio Cometa é um teste aplicado em estudos de toxicogenômica com o potencial de detectar lesões ao DNA, passíveis de correção. Portanto, a técnica não detecta mutações, mas sim danos ao DNA que podem resultar em mutações e evoluir para um câncer. Este é um ensaio simples e de baixo custo, que tem sido utilizado em biomonitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos.

## OBJETIVO

Implementar o teste Cometa no LMA e avaliar se exposições ocupacionais e/ou ambientais a substâncias químicas apresentam risco de desenvolver danos ao DNA, o que pode contribuir para o aparecimento de câncer.

## METODOLOGIA

O Ensaio Cometa é realizado seguindo as recomendações de Tice e colaboradores (2000) e de Speit e Hartmann (2006). A viabilidade celular é avaliada com Azul de Tripán 0,2% em 50 células por indivíduo. Para avaliar o dano ao DNA, amostras de sangue embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% m/v são colocadas sobre lâmina previamente recoberta com gel de agarose de ponto de fusão normal 1,5% m/v e posteriormente lisadas para permitir o desdobramento do DNA (Figura 1).

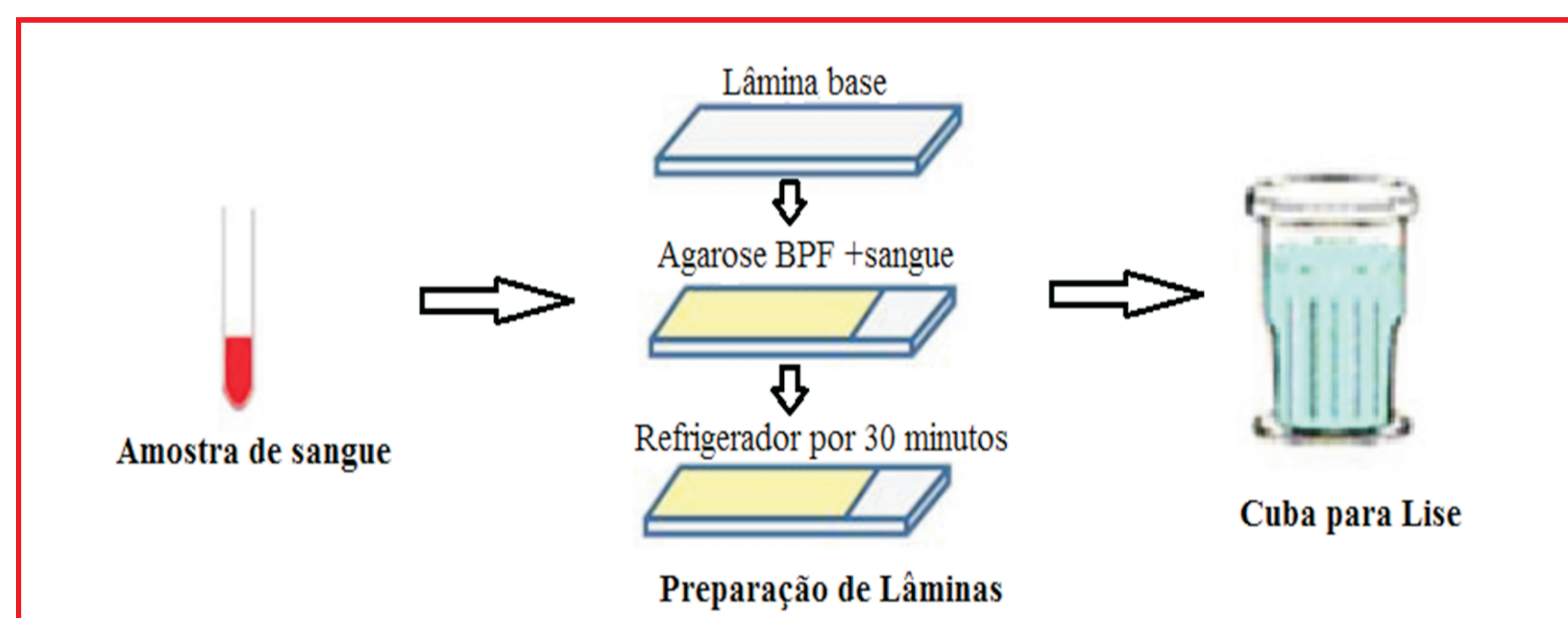


Figura 1. Esquema representativo da lise celular.

Após a lise as amostras são transferidas para solução tampão alcalina (pH>13) e mantidas por 20 minutos para permitir a expressão de sítios álcali-lábeis. As amostras são submetidas a eletroforese por 20 minutos em corrente elétrica de 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA, em seguida são neutralizadas, fixadas em etanol absoluto e secas à temperatura ambiente. A coloração das lâminas será realizada com brometo de etídio (20 µg/ml) e permitirá avaliar a migração do DNA em 150 células por voluntário. O dano será classificado arbitrariamente em 4 categorias, que varia de “0” a “3” (Figura 2).

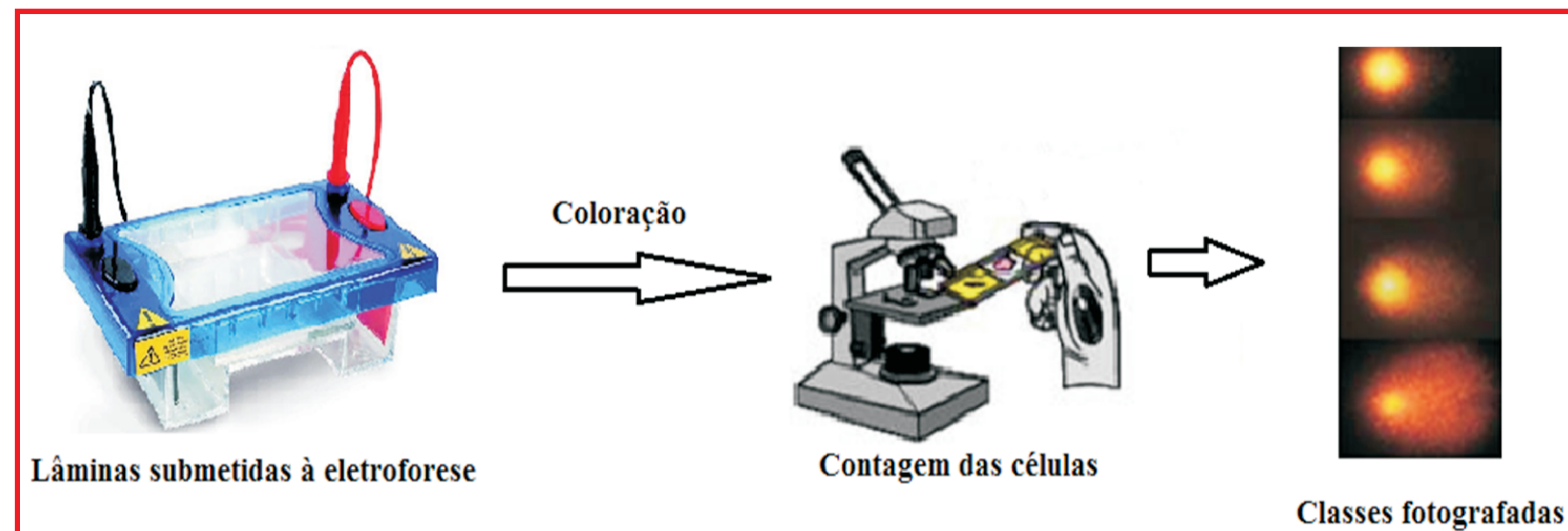


Figura 2. Esquema representativo da eletroforese e observação ao microscópio de fluorescência.

## RESULTADOS

- O Ensaio foi implementado no LMA para avaliar o risco de danos ao DNA em agricultores expostos a agrotóxicos do município de Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro.
- Até o momento foi realizado o ensaio nas amostras de sangue de 39 voluntários, mas apenas a leitura da viabilidade celular foi realizada.
- A viabilidade se mostrou superior a 90% (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade celular observada nos diferentes grupos de exposição aos agrotóxicos.

Grupos	Células avaliadas		Viabilidade (%)
	Mortas	Total	
Controle (N=17)	26	1035	97,4
Morador (N=10)	14	548	97,4
Aplicador (N=12)	37	634	94,1

## CONCLUSÃO

- O ensaio de citotoxicidade mostrou ótima viabilidade celular, sendo admitidos para o ensaio apenas amostras com viabilidade superior a 70%.
- A avaliação da genotoxicidade ainda está em andamento não permitindo conclusões parciais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Speit G; Hartmann A. (2006) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* v. 314, p.275-286.
- Tice RR, Agurell E, Anderson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki Y (2000) “Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for *in Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206-221.

Financiamento: INCA/MS; FAPERJ; OPAS.