

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Governo do Estado de São Paulo

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba
Curso Superior em Sistemas Biomédicos

WEIJUN YU

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA CÉLULAS VEGETAIS DE
Tradescantia pallida

SOROCABA
2º Semestre/2016

INTRODUÇÃO

O Ensaio do Cometa, ou Eletroforese em Gel de Célula Única, é um método de estudo genotoxicológico sensível, que avalia danos ao DNA de células individuais e possibilita quantificar quebras da fita. As células embebidas em agarose sobre uma lâmina de microscópio são lisadas com detergente e sal elevado, para formar nucleóides contendo laços de DNA superenrolados ligados à matriz nuclear. A eletroforese em alto pH resulta em estruturas semelhantes a cometas, que podem ser observados por microscopia de fluorescência, quando o corante for brometo de etídio (LIMAN, 2013) ou em microscópio óptico comum, quando se utiliza a impregnação pela prata (CERDA et al., 1997). A intensidade da cauda do cometa em relação à cabeça reflete o número de quebras no DNA. A base provável para isso é que, os anéis contendo uma pausa perdem seu superenrolamento (“supercoiling”) e tornam-se livres para correr em direção ao ânodo.

Tradicionalmente, a coloração do material é feita com brometo de etídio e analisada por microscopia de fluorescência, tendo intensidade proporcional à quantidade de DNA presente. Porém, essa coloração apresenta alguns fatores negativos, como ação mutagênica do corante, curta durabilidade da coloração e necessidade de equipamentos específicos para análise das lâminas. Por esses motivos, mais recentemente, a coloração por prata vem sendo utilizada como uma alternativa eficaz para o ensaio, demonstrando alta sensibilidade quando comparada à coloração por brometo de etídio (REINHARDT-POULIN et al., 2000). Algumas das vantagens são: a análise é feita em microscópio óptico comum, o método apresenta baixo custo, a coloração do material mantém-se estável por período prolongado (KIZILIAN et al., 1999; NADIN et al., 2001) e há confiabilidade para análise da morfologia de cometas associada aos parâmetros de análise visual (GARCÍA et al., 2004, ANDRADE et al., 2004), possibilitando rápida obtenção de resultados.

O ensaio tem aplicações em testes de novos produtos químicos, para a genotoxicidade, monitoramento de contaminação ambiental com genotoxinas, biomonitorização humana, epidemiologia molecular e investigação fundamentais em danos e reparo do DNA (COLLINS, 2004). Qualquer tipo celular pode ser avaliado, animal ou vegetal, bastando que haja presença de núcleo, e uma característica importante do ensaio é que apenas pequena quantidade de células, pode ser utilizada.

As técnicas do ensaio cometa foram desenvolvidas principalmente por Östling e Johanson (1984), pela metodologia de eletroforese do DNA em micro-gel, sob condições

neutras; e de Singh e colaboradores (1988), que lhe atribuíram maior sensibilidade através do uso de soluções alcalinas no método ($\text{pH} \geq 13$).

Medidas como o comprimento total da “cauda” e a densidade de DNA fornecem dados indiretos sobre o estado do DNA da amostra (BRIANEZI et al., 2009). Têm sido considerados dois princípios que determinam o padrão de formação do cometa. O primeiro é a habilidade de migração dos fragmentos de DNA, que é uma função tanto do tamanho do DNA quanto do número de fragmentos quebrados que se unirão a fragmentos maiores do DNA, que podem migrar uma curta distância desde o núcleo. O outro é a extensão de migração dos fragmentos de DNA, que inicialmente aumenta com o dano, porém, atinge um máximo, que é definido pelas condições da eletroforese, mas não pelo tamanho dos fragmentos (FAIRBAIRN et al., 1995).

Comparada com outras técnicas a do cometa apresenta algumas vantagens, dentre elas: apresenta sensibilidade em apontar baixo nível de danos no DNA, requerendo baixo número de células por amostras, flexibilidade, baixo custo, fácil aplicação, habilidade de conduzir estudos utilizando pequenas porções de substâncias e tempo relativamente curto para a realização de experimentos (TICE et al., 2000).

MATERIAS E MÉTODO

Materiais

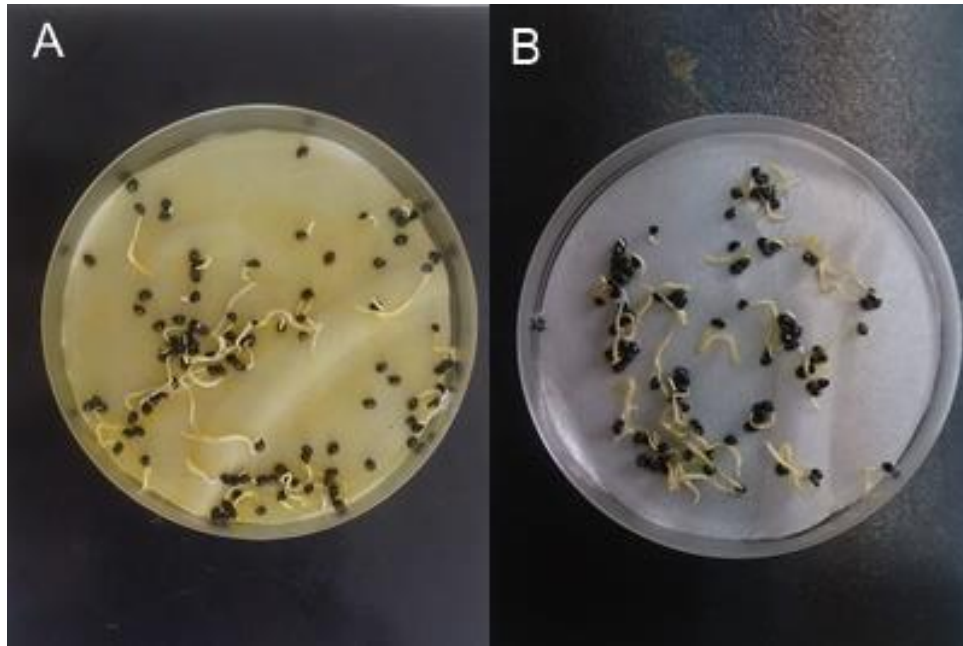
Amostra de Raízes de *Allium cepa*

*Cultivo das Amostras de Raízes de *Allium cepa**

Em duas placas de Petri contendo 100 sementes de *Allium cepa* cada sobre uma folha de papel filtro umedecido com 2 ml de água da torneira. A placa é vedada por filme plástico e colocado em um local fresco e abrigada da luz até a germinação das sementes (cerca de 2 cm).

Uma das placas contendo as sementes já germinadas é acrescido 2 ml de trifuralina ou formol e, em seguida encubado por mais 24. Esta será a placa exposta enquanto a outra será a de controle negativo (LIMAN, 2013).

Figura 2 – (A) Amostra de *Allium cepa* exposto a trifluralina; (B) Amostra sem exposição.

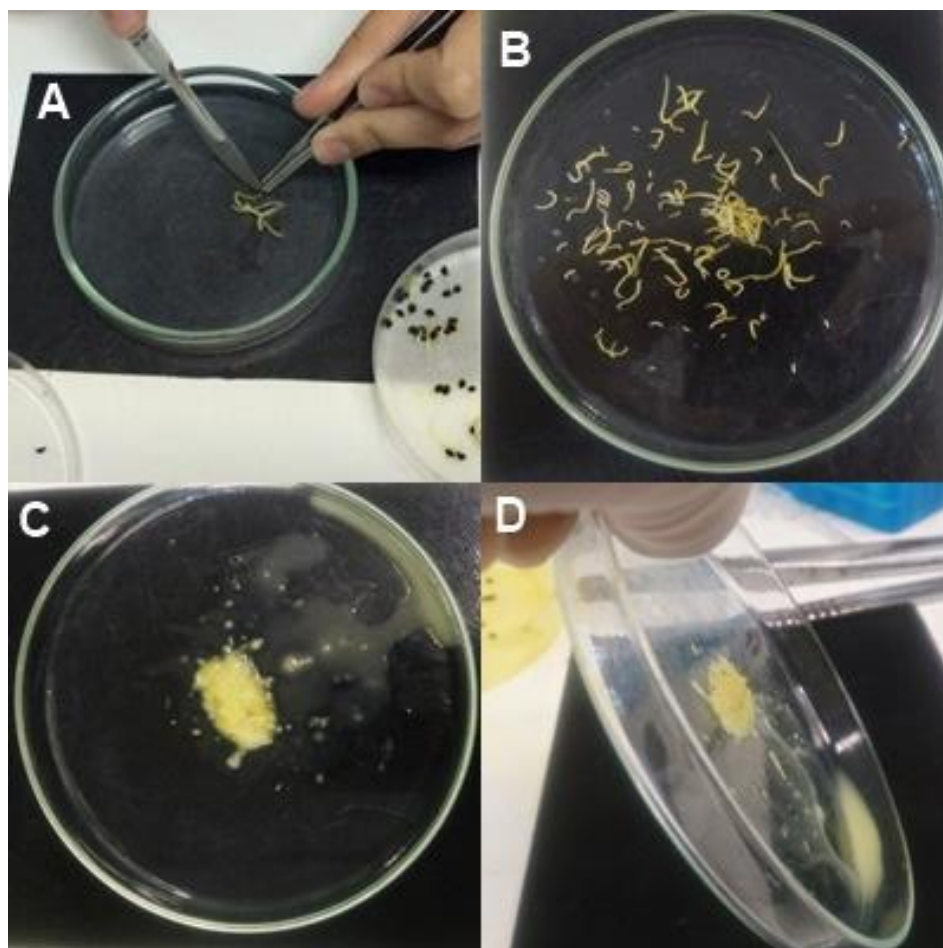


Fonte: Oliveira, 2015.

Preparo das Amostra de Raízes de *Allium cepa*

As raízes são cortadas com um bisturi, descartando as sementes e em seguida maceradas com 500 μ l de PBS numa placa de Petri e depois espremidos com a ajuda de uma lâmina limpa, o líquido resultante é inclinado para escorrer e sugado por uma pipeta e armazenado num micro tubo (LIMAN, 2013).

Figura 3 - Procedimento para obtenção da amostra. (A) separação das raízes e das sementes; (B) raízes já separadas; (C) raízes trituradas com tampão; (D) mistura de tampão e raízes trituradas escorrendo para ser coleta.



Fonte: Oliveira, 2015

Amostras de Folhas jovens de *Tradescantia pallida* (Figura 2)

Figura 4 – Folhas jovens de *Tradescantia pallida*.



Fonte: Autor

Plantio da *Tradescantia pallida*

As *Tradescantia pallida* foram cultivados em vasos (22 cm de diâmetro e 17 cm de altura) (Figura 3) na área externa do laboratório de Ecotoxicologia do NEPA da Fatec – Sorocaba, utilizando substrato orgânico controlado, sendo 1:4 de vermiculita, 1:4 húmus de minhoca e 1:2 de terra vegetal.

Figura 5 – Vaso de *Tradescantia pallida*



Fonte: Autor

Preparo das Amostras Segundo o protocolo de LIMAN (2013), a amostra deve ser macerada com 200 μ l de PBS. Enquanto no artigo de LEITE (2013) as folhas jovens devem ser colhidas, lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. Após estes processos, as folhas são maceradas com 5 ml de PBS acrescido de EDTA e peneirado.

*Observação: quanto mais macerar melhor será a visualização das células.



Reagentes

Ácido Acético;

Agarose Ponto de Fusão Normal (APFN);

Agarose Low Melting Point (Baixo Ponto de Fusão) (ABPF);

Carbonato de Sódio;

DMSO;

EDTA;

Formol;

Glicerina (Glicerol);

H₂O_d (Água destilada e deionizada);

HCL (Ácido clorídrico);

MgCl₂ (Cloreto de Magnésio);

N-Lauroyl-Sarcosine;

NaCL (Cloreto de Sódio);

NaOH (Hidróxido de Sódio);

Nitrato de Amônio;

Nitrato de Prata;

Sulfato de zinco Heptahidratado;

Tris;

Triton X-100;

Soluções

Solução de Lise (Estoque) - (Protocolo de SINGH et al., 1988)

Tabela 1 – solução de Lise (estoque)

Reagente/Solução	Quantidade
NaCL	146,1 g (2,5M)
EDTA	37,2 g (100mM)
Tris	1,2 g (10 mM)
N-lauroyl-sarcosine	10 g (1%)
H ₂ O _d	1000 ml (q.s.p.)

Preparo:

Ajustar o pH para 10, antes de colocar o N-lauroyl-sarcosine;

Completar para 1000 ml com H₂od.;

Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Solução de Lise (Uso) – (Protocolo de SINGH et al., 1988)

Tabela 2 – Solução de Lise (uso)

Reagente / Solução	Quantidade
Triton - X 100	1ml
DMSO	10 ml
Solução de Lise (estoque)	100 ml (q.s.p.)

Preparo:

Essa solução deve ser feita na hora do uso;

Deve ser colocada na geladeira até atingir no mínimo 4°C.

Solução de Lise – (Protocolo de LIMAN, 2013)

Tabela 3 – Solução de Lise

Reagente/Solução	Quantidade
NaCl	14.61 g
NaOH	0,3 g
H ₂ O _d	250 ml

Preparo:

Esta solução deve estar em pH alcalino, aproximadamente 12,3;

Deve ser armazenada na geladeira.

Solução de EDTA (A)

Tabela 4 – Solução de EDTA (A)

Reagente/Solução	Quantidade
EDTA	14,89 g
H ₂ O _d	200 ml (q.s.p.)

Preparo:

O pH deve ser ajustado para 10 com HCl;

Consevar em temperatura ambiente.

Solução de NaOH (B)

Tabela 5 – Solução de NaOH (B)

Reagente/Solução	Quantidade
NaOH	200 g
H ₂ O _d	500 ml (q.s.p.)

Preparo:

Completar em 500 ml com água destilada;

Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Solução de Eletroforese – (Protocolo de SINGH et al., 1988)

Deve-se fazer separadas as soluções: A (EDTA) e B (NaOH);

Em balão volumétrico, reagir 5 mL de solução A com 30 mL de solução B, completando para 1L com H₂O destilada;

O pH deve ser ajustado para >13 com NaOH.

Solução de Eletroforese – (Protocolo de LIMAN, 2013)

Tabela 6 – Solução de Eletroforese

Reagente/Solução	Quantidade
EDTA	0,219 g
NaOH	0,6 g
H ₂ O _d	500 ml

Preparo:

Esta solução deve ter pH alcalino, aproximadamente 12,3;

Deve ser armazenada na geladeira.

Solução de Neutralização

Tabela 7 – Solução de Neutralização

Reagente/Solução	Quantidade
Tris	48,5 g (0,4 M)
H ₂ O _d	1000 ml (q.s.p.)

Preparo:

O pH deve ser ajustado para 7,5 com HCl ou NaOH;

Conservar em temperatura ambiente abrigada da luz.

Agarose – Ponto de Fusão Normal – 1,0%

Tabela 8 – Agarose de Ponto de Fusão Normal – 1,0%

Reagente/Solução	Quantidade
Agarose PFN	200 mg
PBS (livre de Ca ⁺⁺ e	20 ml

Mg⁺⁺) ou Tris –
MgCl₂

Preparo:

Diluir a Agarose de Ponto de Fusão Normal, deixando-a ferver por três vezes no micro-ondas.

Ponto de Fusão Normal – 1,5%

Tabela 9 – Agarose de Ponto de Fusão Normal – 1,5%

Reagente/Solução	Quantidade
Agarose PFN	300 mg
PBS (livre de Ca ⁺⁺ e Mg ⁺⁺) ou Tris – MgCl ₂	20 ml

Preparo:

Diluir a Agarose de Ponto de Fusão Normal, deixando-a ferver por três vezes no micro-ondas.

Agarose – Low Melting Point (Baixo Ponto de fusão) – 0,5%

Tabela 10 – Agarose Low Melting Point (Baixo Ponto de Fusão) – 0,5%

Reagente/Solução	Quantidade
Agarose LMP	100 mg
PBS (livre de Ca ⁺⁺ e Mg ⁺⁺) ou Tris – MgCl ₂	20 ml

Preparo:

Diluir a Agarose Low Melting Point, deixando-a ferver por três vezes no micro-ondas, até que se dissolva por completo.

Agarose – Low Melting Point (Baixo Ponto de fusão) – 0,8%

Tabela 11 – Agarose Low Melting Point – 0,8%

Reagente/Solução	Quantidade
------------------	------------

Agarose LMP	160 mg
PBS (livre de Ca ⁺⁺ e Mg ⁺⁺) ou Tris – MgCl ₂	20 ml

Preparo:

Diluir a Agarose Low Melting Point, deixando-a ferver por três vezes no micro-ondas, até que se dissolva por completo.

Tampão PBS (livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) – (Protocolo de SINGH et al., 1988)

Tabela 12 – Tampão Fosfato Salina (PBS) (Livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺)

Reagente/Solução	Quantidade
KCl	0,2 g (74,55M)
KH ₂ HPO ₄	0,2 g (136,09M)
NaCl	8,0 g (58,44M)
Na ₂ HPO ₄	1,15 g (141,96M)
H ₂ O _d	1000 ml (q.s.p.)

Preparo:

Acertar o pH em 7,4. Estocar na geladeira.

Tampão PBS acrescido de EDTA – (LEITE, 2013)

Tabela 13 - Tampão PBS acrescida de EDTA

Reagente/Solução	Quantidade
PBS (livre de Ca ⁺⁺ e Mg ⁺⁺) ou Tris – MgCl ₂	20 ml
EDTA	2,72 g

Preparo:

Suspender o EDTA em PBS num agitador magnético até ficar homogêneo.

Tampão Tris- MgCl₂ – (Protocolo de LIMAN, 2013)

Tabela 14 – Tris-MgCl₂

Reagente/Solução	Quantidade
Tris	6,055 g
MgCl ₂	0,203 g
H ₂ O _d	250 ml

Preparo:

Acertar o pH em 7,4. Estocar na geladeira.

Solução Fixadora

Tabela 15 – Solução Fixadora

Reagente/Solução	Quantidade
Ácido Tricloroacético	150 g
Sulfato de Zinco Heptahidratado	50 g
Glicerol	50 ml
	1000 ml
H ₂ O _d	(q.s.p.)

Preparo:

Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Soluções de Coloração

Tabela 16 – Solução de Coloração “A” (Estoque)

Reagente/Solução	Quantidade
Carbonato de Sódio	50 g
	1000 ml
H ₂ O _d	(q.s.p.)

Preparo:

Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Tabela 17 – Solução de Coloração “B” (Estoque)

Reagente/Solução	Quantidade
Nitrato de Amônio	1 g

Nitrato de Prata	1 g
Ácido Tungstosilícico	2,5 g
Formol	1,5 ml
H ₂ O _d	1000 ml (q.s.p.)

Preparo:

Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Para o preparo da Solução de Coloração adicionar:

53 mL da “A” com;

27 mL da “B” em cada cuba (que deve ser coberta com papel alumínio).

Solução de Parada

Tabela 18 – Solução de Parada

Reagente/Solução	Quantidade
Ácido Acético	10 ml
H ₂ O _d	1000 ml (q.s.p.)

Observação:

Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Aparelhos

Agitador magnético e aquecedor (Marca: Nova, modelo:NI 1104);

Balança de Precisão (Marca: AND, modelo: HR-200);

Cuba de Eletroforese (Marca: Kasvi; modelo: K33-10H)

Fonte de Eletroforese (Marca Kasvi);

Fonte Elétrica “comum” (Marca; Kenntech; modelo: KPS-303);

Micro-ondas (Marca Eletrolux, modelo: MAG41);

Microscópio (Marca Zeiss, modelo: Primo Star);

PHmetro (Marca Jenway, modelo: 3510 pH Meter).

Vidrarias

Balão Volumétrico;

Lâminas fosca lapidada (Precision Glass Line);

Lamínulas para microscopia (Precision Glass Line);

Pipeta Automática (Labmate Soft);

Proveta;

Placa de Petri.

Outros

Gelo;

Gral com pistilo;

Filtro de Papel;

Papel Alumínio;

Peneira.

Método

Preparo das Lâminas

As lâminas foram cobertas com uma camada de agarose (ponto de fusão normal) com 1% ou 1,5% de concentração em PBS (proctolo de Singh et al., 1988), ou em Tampão Tris- MgCl₂ (protocolo de Liman, 2013), por cerca de 24 horas antes do experimento ser realizado. Foram testadas duas concentrações de agarose a fim de observar qual delas resultaria em melhor preparação para a corrida eletroforética.

Após a obtenção da amostra foram misturados 20µL desta preparação e 100µL de Agarose *Low Melting Point* (ABPF) (protocolo de Liman, 2013). Em seguida transferiu-se 100µL dessa mistura para a lâmina e cobriu-se com uma lamínula para conter o material sobre a lâmina, numa fina camada.

Em seguida as lâminas ficaram na geladeira por cerca de 20 minutos para que a ABPF pudesse solidificar sobre a lâmina. As lamínulas foram retiradas após o endurecimento da ABPF, cuidadosa e lentamente a fim evitar a retirada do material.

Lise

Depois de retirar as lamínulas das lâminas e com o material incluído na ABPF, deixou-se em solução de lise (uso) (SINGH et al., 1988) ou solução de lise (LIMAN, 2013) por 1 hora dentro da geladeira. Nesta etapa, a solução de lise alcalina deve romper as membranas celulares para expor o material genético.

Após isso, as lâminas foram lavadas por 5 minutos com solução de neutralização ou PBS. A solução utilizada nesta fase, tem o objetivo de neutralizar a solução de lise que tem pH 10, que é bastante alcalino. Assim, este procedimento é responsável por limitar o processo de lise.

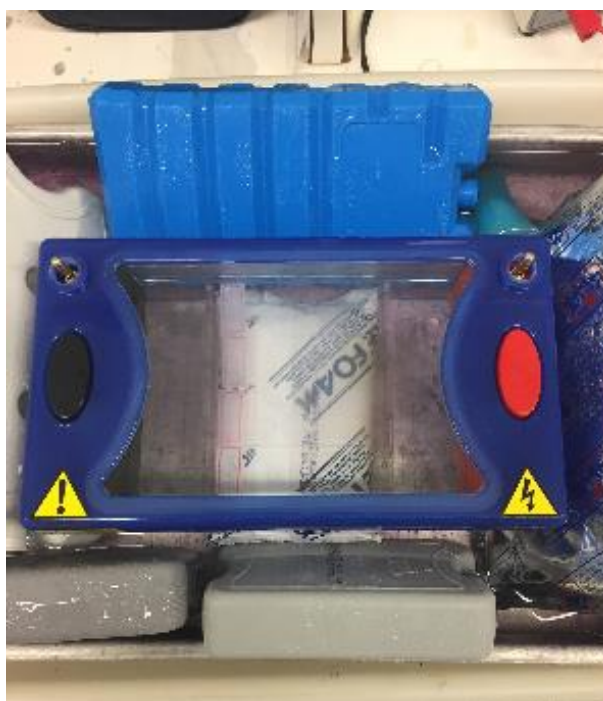
Eletroforese

Seguindo protocolo de Singh et al., 1988, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese e deixar descansaram em solução de eletroforese por 20 minutos. E seguindo o protocolo de LIMAN (2013), as lâminas foram deixadas na cuba de eletroforese, descansando em solução de eletroforese (LIMAN, 2013) por 1 hora. A solução de eletroforese é rica em íons, os quais são responsáveis pela hidrólise da água, que por sua vez permite a troca entre elétrons e íons.

Em seguida ligou-se a fonte de eletroforese com 300 mA e 36 V seguindo o protocolo de Singh et al. (1988), e pelo protocolo de Liman (2013) é necessário de 25 V, ambos por 20 minutos. Colocar a cuba de eletroforese no gelo para proteger o material genético da desnaturação, decorrente da energia térmica gerada pela corrente elétrica. Após a eletroforese lavou-se as lâminas por 3 vezes de 5 minutos com solução de neutralização e 2 vezes com H₂O_d, respectivamente. Colocou-se as lâminas em estufa a 37 °C por uma hora e meia (1,5 h) para secagem. Se for mais conveniente, pode-se deixar as lâminas secando à temperatura ambiente, por 24 horas.

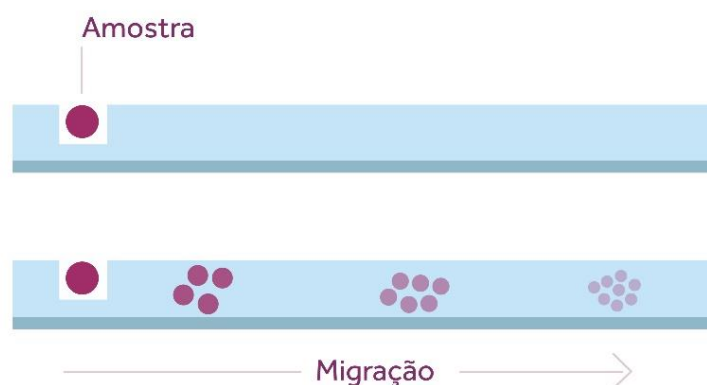
Após este passo, as lâminas foram deixadas por 10 minutos em solução fixadora e lavadas 3 vezes com H₂O_d. E novamente levadas para estufa de secagem a 37°C por uma hora e meia. Após secas, reidratadas por 5 minutos com H₂O_d.

Figura 7 – Cuba de eletroforese contendo as amostras.



Fonte: Autor

Figura 8 – Migração fragmentos de acordo com o peso molecular.



Fonte: Kasvi, 2016.

Coloração

Durante o procedimento de coloração as luzes do laboratório foram apagadas a fim de impedir a oxidação da prata presente na solução de coloração (solução B) e também de quebras adicionais no DNA ou RNA. A solução de coloração foi feita com 53 mL da solução de coloração “A” com 27 mL da solução de coloração “B”, que foram misturadas diretamente num recipiente, o mesmo onde as lâminas devem estar alocadas. Esse recipiente deve ser coberto com papel alumínio para evitar o contato da solução de coloração com a luz. Deixar as lâminas por 35 minutos em solução de coloração. Em seguida, lavar por 3 vezes com H₂O, deixar em solução de parada por 5 minutos e lavar novamente 3 vezes com H₂O.

As lâminas foram secas em temperatura ambiente para em seguida observar num microscópio óptico comum (LIMAN, 2013).

Análise das Lâminas

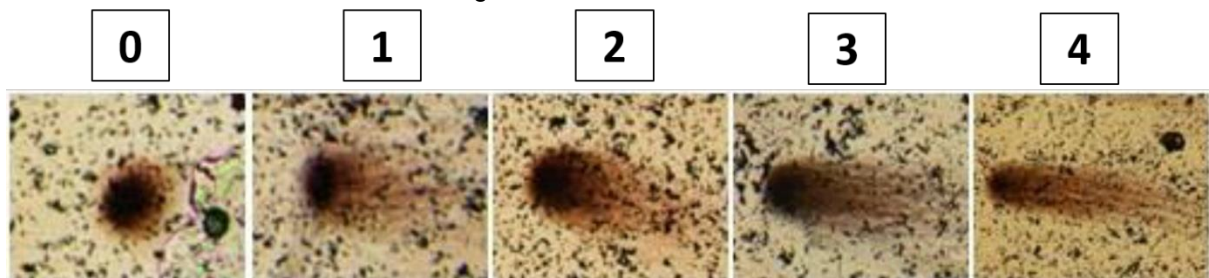
As lâminas devem ser analisadas com um microscópio óptico, que permite a visualização das seguintes imagens microscópicas: com contorno circular (sem danos no DNA) ou estruturas em forma de “cometa” (com danos no DNA).

As células podem ser classificadas em cinco categorias (0-4) correspondente às seguintes quantidades de danos na cauda do DNA:

- ✓ Nível 0 → sem danos (<5%)
- ✓ Nível 1 → baixo nível de danos (5-20%)
- ✓ Nível 2 → médio nível de danos (20-40%)
- ✓ Nível 3 → alto nível de danos (40-95%)
- ✓ Nível 4 → dano total (>95%)

Para cada lâmina, 50 núcleos devem ser escolhidos aleatoriamente e analisados utilizando um microscópio óptico comum (LIMAN, 2013).

Figura 9: Níveis de cometa



Fonte: Singh, 1988.

RESULTADO

O objetivo do presente trabalho foi realizar a padronização do teste do Cometa para células vegetais de *Tradescantia pallida*, afim de estabelecer um protocolo para avaliação da genotoxicidade nestas células, acrescentando mais uma ferramenta aos protocolos já estabelecidos neste laboratório.

O desenvolvimento do estudo fundamentou-se em protocolos descritos por vários autores. Os resultados melhores obtidos foram, na maior parte, baseados no protocolo de Liman (2013), que é originalmente aplicado a células de *Allium cepa*. Apesar disso, os primeiros resultados utilizando células de *Allium cepa*, em nossas condições de laboratório, foram frustrantes, pois não havia células nas lâminas e pôde-se observar uma grande perda do material devido a problemas na fixação da amostra na agarose *low melting*, que é o primeiro passo do ensaio.

Um novo ensaio foi realizado, atentando-se para este passo, mas novamente houve muita perda de material durante as etapas de lise e de incubação em solução de eletroforese. Desta vez levantou-se a hipótese de que o excesso de tempo de imersão das lâminas nas etapas de lise alcalina ou na incubação em solução de eletroforese, também bastante alcalina, poderia estar prejudicando o experimento. Pensando nessa possibilidade recorreu-se a outras publicações a fim de, se buscar soluções de modo que, reduziu-se este tempo de incubação de 1 hora para 20 minutos, conforme recomendação de Singh (1988). Com esta alteração, notou-se alguma melhora na fixação da amostra e, não houve interferência com as características da corrida. Contudo a alteração não foi efetiva o suficiente para solucionar o problema. A falha poderia ter mais de uma causa e, a partir disso buscamos novamente, outras variações nos procedimentos anteriores, como, o procedimento de preparo da agarose e das lâminas.

Com o intuito de resolver essas contradições, observou-se que no artigo de Leite (2013), recomendava-se uma concentração de ágar *low melting* (0,8%) maior que o de Liman (2013) (0,5%), o que em tese, poderia melhorar a fixação, pois o aumento da concentração, aumenta a densidade da preparação. Com a realização desta alteração confirmou-se a melhora na fixação e, com a finalidade de melhorar mais ainda a fixação evitando qualquer desprendimento do amaterial, foi acrescentada uma camada extra de agarose sobre a amostra já solidificada, formando um “sanduíche” e também foi aumentado o tempo de refrigeração das amostras de 20min conforme o protocolo de

Liman (2013) para 30min. tanto na primeira camada quanto na camada extra. Deste modo, estas modificações foram padronizadas para os experimentos seguintes.

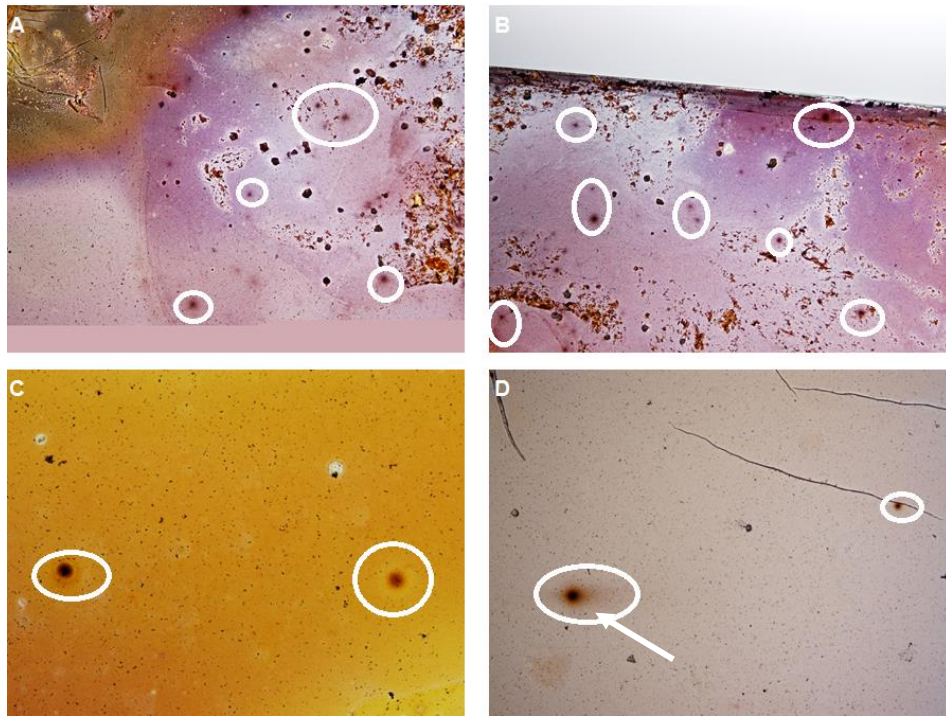
Com essas alterações constatou-se uma melhora significativa em relação aos resultados dos primeiros experimentos nos quais havia grandes perdas das amostras. Entretanto outros problemas persistiam, como o reduzido número de células encontrado nas lâminas após a coloração, quando se comparava com o mesmo procedimento realizado com amostras de sangue, onde nota-se abundância de células. Este fato, descarta qualquer possibilidade de falha no procedimento da corrida de eletroforese.

Pensou-se então, na possibilidade de falhas durante preparação das amostras, o que poderia afetar a obtenção de número adequado de células. Deste modo, observando-se o artigo de Leite (2013), constatou-se que a preparação da amostra era distinta do modo de preparo de Liman (2013), uma vez que Liman descrevia a amostra macerada com 5µl de PBS, e Leite com 5ml de PBS acrescido de EDTA. Adotando-se esta alteração percebeu-se maior número de células fixadas. Foi também testada a aplicação da centrifugação das amostras, a fim de concentrar a quantidade de células, mas não se obteve sucesso, portanto, esta alteração foi descartada, voltando ao método anterior.

Com essas últimas alterações bem-sucedidas, pode-se afirmar que a padronização foi alcançada satisfatoriamente, já que foi possível visualizar nucleóides e cometas de células de *Tradescantia pallida* nas lâminas coradas pela prata, ainda não se conseguiu obter lâminas com número suficiente de nucleóides para quantificação.

A pesquisa deve continuar para se refinar o protocolo e finalmente, se obter o resultado satisfatório, quanto ao número de células.

Figura 10 – (A; B; C) Nucleóides de *Tradescantia pallida* isolados sem danos (10X); (D) Cometa e nucleóide sem danos isolado (10X). A seta aponta cometa.



Fonte: Autor

CONCLUSÃO

O processo de padronização do ensaio do cometa com células vegetais apresenta complicações relacionadas às sutilezas da técnica como, a fixação e a preparação das amostras as quais devem ser rigorosamente observadas na condução dos experimentos.

A padronização do ensaio do cometa com células vegetais de *Tradescantia pallida* foi alcançada satisfatoriamente, porém não foi possível realizar a análise quantitativa e será necessário a realização de mais experimentos para o aprimoramento da técnica.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M.M., 2008 apud LEITE, A.S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A.

Avaliação da Genotoxicidade Provocada por Fatores Ambientais em *Tradescantia pallida* cv *purpúrea* através do Ensaio Cometa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n.11, 2013, p. 399-417.

BATALHA, J.R.F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; DEUR, T.; CARVALHO, H.A.; ALVES, E.S.; DOMINGOS, M.; RODRIGUES, G.S.; SALDIVA, P.N.H. **Exploring the clastogenic effects of air pollution in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia micronuclei* assay.** *Mutation Research* 426:229-232, 1999.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. comparative studies by comet test and SCE in human lymphocytes from 200 healthy subjects. **Mutation Research**, v. 343, p. 201-207. 1995.

BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. **Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata.** *Bras Patol Med Lab*, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 325-334, ago 2009.

CENTRO PAULA SOUZA. Histórico da Instituição. Disponível em:

<<http://www.cps.sp.gov.br/quem-somos/perfil-historico/>>. Acesso em: 20 de agosto de 2016.

CERDA, H.; DELINCÉE, H.; HAINE, H.; RUPP, H.(1997). **The DNA‘comet assay’ as a rapid screening technique to control irradiated food**. Mutat.Res. 375, 167–181. doi:10.1016/S0027-5107(97)00012-2.

CHAPMAN, P. M. Emerging substances — **Emerging problems?** Environmental Toxicology and Chemistry, v.25, n.6, p.1445-1447. 2006. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=356>. Acesso em: 19 de mar. 2016

CHAPMAN, P. M. **Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology**. Marine Pollution Bulletin, v.44, p.7-15. 2002. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=356>. Acesso em: 19 de mar. 2016

COTELLE, S.; FÉRARD, J.F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Environment and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p. 346-255. 1999.

COLLINS, A. R. **The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations**. Mol Biotechnol, v. 26, n.3, p. 249-61, mar. 2004.

DELINCÉE, H., 1996. CERDA, H.; DELINCÉE, H.; RUPP, H., 1997. CERDA, H.; KOPPEN, G., 1998 APUD LEITE, A.S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da Genotoxicidade Provocada por Fatores Ambientais em *Tradescantia pallida cv purpúrea* através do Ensaio Cometa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n.11, 2013, p. 399-417.

DOUST, J.L.; SCHMIDT, M.; DOUST, L.L. Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. Biol Rev Camb Philos Soc. 1994 May;69(2):147-86.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O’NEILL, K.L. The comet Assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FATEC SOROCABA. **A Fatec Sorocaba**, 2016. Disponível em: <<http://www.fatecsorocaba.edu.br/afatec.asp>>. Acesso em: 17 de agosto de 2016

GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. 2004. **Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining.** Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag., 556(1-2): 25-34.

GUIMARÃES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI JR, N.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; SALDIVA, P.H.N. **Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the Tradescantiamicronucleus (Tra- MCN) assay.** Environ.Exp.Bot. 44,1-8, 2000.

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

JHA, A.N. **Ecotoxicological applications and significance of the comet assay Mutagenesis.** 2008 May;23(3):207-21. doi: 10.1093/mutage/gen014. Epub 2008 Apr 1.

KAPPEL, B. P., 2007 apud LEITE, A.S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da Genotoxicidade Provocada por Fatores Ambientais em *Tradescantia pallida* cv *purpúrea* através do Ensaio Cometa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n.11, 2013, p. 399-417.

KASVI. Princípios da Técnica de Eletroforese. Disponível em: <<http://www.kasvi.com.br/principios-da-tecnica-de-eletroforese/>>. Acesso em: 20 de agosto de 2016.

KIZILIAN, N.; WILKINS, R. C.; REINHARDT, P.; FERRAROTTO, C.; MCLEAN, J. R. N.; MCNAMEE, J. P. 1999. **Silver-stained comet assay for detection of apoptosis.** **Biotechniques**, 27: 926-930.

LAU, A.H., 2002 apud LEITE, A.S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da Genotoxicidade Provocada por Fatores Ambientais em *Tradescantia pallida* cv *purpúrea* através do Ensaio Cometa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n.11, 2013, p. 399-417.

LEITE, A.S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da Genotoxicidade Provocada por Fatores Ambientais em *Tradescantia pallida cv purpúrea* através do Ensaio Cometa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n.11, 2013, p. 399-417.

LIMAN, R. **Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and Comet assay**. Chemosphere. 2013 Sep; 93(2):269-73. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.076. Epub 2013 Jun 20.

MARSHAK, A. 1937. **The effect of X-rays on chromosomes in mitosis**. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 23, 362.

MAURICI, D.; AARDEMA, M.; CORVI, R.; KLEBER, M.; KRUL, C.; LAURENT, C.; LOPRIENO, N.; PASANEN, M.; PFUHLER, S.; PHILLIPS, B.; SABBIONI, E.; SANNER, T.; VANPARYS, P. (2005) **Genotoxicity and mutagenicity**. Altern Lab Anim 33(Suppl 1):117–130

MARSHAK, A. 1937. **The effect of X-rays on chromosomes in mitosis**. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 23, 362.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. 2001. **A silver staining method for single-cell gel assay**. J. Histochem. Cytochem., 49(9): 1183-1186.

READ, J. 1959. Radiation Biology of *Vicia faba* in Relation to the General Problem. C.C. Thomas, Springfield.

OLIVEIRA, D. **Padronização do Ensaio Cometa para Análise de Células vegetais de *Allium cepa***. Faculdade de Tecnologia de Sorocaba, Sorocaba, 2015.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J., 1984 apud LEITE, A.S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da Genotoxicidade Provocada por Fatores Ambientais em *Tradescantia pallida cv purpúrea* através do Ensaio Cometa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n.11, 2013, p. 399-417.

PEDRO, J., 2008 apud LEITE, A.S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da Genotoxicidade Provocada por Fatores Ambientais em *Tradescantia pallida cv purpúrea* através do Ensaio Cometa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n.11, 2013, p. 399-417.

REINHARDT-POULIN, P.; MCLEAN, J. R.; DESLAURIERS, Y.; GORMAN, W.; CABAT, S.; ROUABHIA, M. 2000. **The use of silver-stained “comets” to visualize DNA damage and repair in normal and Xeroderma pigmentosum fibroblasts after exposure to simulated solar radiation.** J. Photochem. Photobiol. B. Biol., 71(4): 422-425.

RILEY, H.P. 1936. **The effect of X-rays on the chromosomes of Tradescantia gigantea.** Cytologia 7, 131 - 142.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. 1999. **Single cell gel eletrophoresis assay: methodology and applications.** J. Chromatogr. B, 722: 225-254.

SANT'ANNA, E.T.G. **Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de riscos utilizando bioindicadores vegetais do gênero**

SAVÓIA, E.J.L. **Potencial de Tradescantia pallida cv. Purpurea para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André- São Paulo, por meio do bioensaio Trad-MCN e do acúmulo foliar de elementos tóxicos.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SAVÓIA, E.J.L.; DOMINGOS, M.; GUIMARÃES, E.T.; BRUMATI, F.; SALDIVA, P.H.N. **Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo André,SP,Brazil, through Trad-MCN bioassay.** Ecotoxicology and Environmental Safety.v 72, p.255-260, 2009.

SILVA, M.D. **Delimitação de plantas Tradescantia pallida cv. Purpurea cultivadas na cidade de São Paulo para indicação de riscos clastogênicos impostos pela poluição aérea.** Tese (Doutorado em ecologia de ecossistemas terrestres). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Exp Cell Res. 75(1):184-91, 1988.

SOUZA, S.A.M. **Biotestes na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul.** 2005. 89 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas.

SUMITA, N.M. **Avaliação da poluição ambiental da cidade de São Paulo pela análise elementar em plantas (*Tradescantia pallida*), por método de ativação com nêutrons.** Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SUYAMA, F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.; RODRIGUES, G.S.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CARVALHO, H.A.; SALDIVA, P.H.N. **Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clatogenic effects of X-rays.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35: 127-129, 2002.

***Tradescantia*.** Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.E.; SASAKI, Y.F. **Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v.35, p.206-221, 2000.

TICE, R. R.; ANDREWS, P. W.; HIRAI, O.; SINGH, N. P. 1991. **The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells.** In Witmer,C.R., Snyder,R.R., Jollow,D.J., Kalf,G.F., Kocsis,J.J. and Sipes,I.G. (eds),

Biological Reactive Intermediates IV, Molecular and Cellular Effects and their Impact on Human Health. Plenum Press, New York, NY, pp. 157–164

VENTURA, B.C. 2004 apud LEITE, A.S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da Genotoxicidade Provocada por Fatores Ambientais em *Tradescantia pallida* cv *purpúrea* através do Ensaio Cometa. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n.11, 2013, p. 399-417.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVA, J. HENRIQUES, J.A. DNA damage and repair in haemolymph cells of Golden mussel (*Limnoperna fortune*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, v. 605, p. 78-86, 2006.

WANG. W.; FREEMARK, K. **The use of plants for environmental monitoring and assessment**. *Ecotox Environ Safe* 30:289–301, 1995.

