

Carolina Di Paolo

Aplicação do Ensaio Cometa a estudo de danos ao DNA
de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860),
expostos à β -naftoflavona

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico
da Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção de título de Mestre em
Ciências, área de Oceanografia Biológica

Orientador:
Prof. Dr. Phan Van Ngan

São Paulo
2006

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

**Aplicação do Ensaio Cometa a estudo de danos
ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860),
expostos à β -naftoflavona**

Carolina Di Paolo

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências,
área de Oceanografia Biológica

Julgada em ____/____/____

Prof. Dr. Phan Van Ngan

Conceito

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Conceito

Dra. Eliana Nakano

Conceito

Agradecimentos

Ao Dr. Phan, Professor: pelo acompanhamento atento e pela disposição incansável, contribuindo imensamente em minha formação acadêmica e sendo exemplo de postura científica;

Ao Vicente, pelo apoio, sugestões, conversas alegres, entusiasmo contagiante e estímulo sempre;

À Zezé, pelos sábios conselhos práticos, e pela ajuda incalculável durante as atividades experimentais em Ubatuba;

Ao Divaldo, por cuidar dos robalinhos e pela grande ajuda em Ubatuba;

Ao grupo de colegas do Laboratório de Ecofisiologia – Arthur, Cássia, Débora, Felipe, Hermínio, Keyi, Natali, Rosária, Thaís – pelo convívio, amizade, trocas, discussões, conversas e colaboração mútua;

Aos funcionários do IO-USP, pelo fundamental e generoso apoio ao longo de todas as etapas do trabalho;

Aos professores do IO-USP, por compartilharem conhecimentos que ampliaram o fascínio pelos oceanos e pela Oceanografia;

Aos colegas e amigos do Instituto, pela convivência tranqüila e alegre, e pela amizade que cresceu durante nosso período juntos nesse “barco”;

Aos amigos da FMVZ-USP, por acreditarem que a Medicina Veterinária vai além dos animais domésticos;

Ao Italo e à Izabel, que sempre me deram a maior força, e por sempre acreditarem em mim, até em momentos em que eu mesma fiquei em dúvida;

Ao Marcello e ao Fernando, por tudo que me ensinaram em diferentes fases da vida; e às respectivas famílias, pelo carinho e amizade;

Ao Nabor, pela grande paciência, companheirismo, carinho, amizade e pela grande ajuda no período final do trabalho;

Aos amigos, humanos e não-humanos, que compreenderam minhas longas ausências durante a realização desta etapa;

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto de processo 471084 / 2004-2 do CNPq.

CORAZÓN NUEVO

Mi corazón, como una sierpe, / se ha desprendido de su piel,
y aquí la miro entre mis dedos / llena de heridas y de miel.

Los pensamientos que anidaron / en tus arrugas, ¿dónde están?
¿Dónde las rosas que aromaron / a Jesucristo y a Satán?

¡Pobre envoltura que ha oprimido / a mi fantástico lucero!
Gris pergamino dolorido / de lo que quise y ya no quiero.

Yo veo en ti fetos de ciencias, / momias de versos y esqueletos
de mis antiguas inocencias / y mis románticos secretos.

¿Te colgaré sobre los muros / de mi museo sentimental,
junto a los gélidos y oscuros / lirios durmientes de mi mal?

¿O te pondré sobre los pinos, / -libro doliente de mi amor-
para que sepas de los trinos / que da a la aurora el ruiseñor?

Federico García Lorca, 1918.

ABSTRACT

Single Cell Gel Electrophoresis or Comet Assay was applied to study the genotoxic potential of exposure *in vivo* to β -naphthoflavone (BNF) on erythrocytes of fat snook, *Centropomus parallelus*. Specific conditions for the comet assay on fat snook blood cells were established based on information obtained from literature together with results of experiments in which slides were exposed *in vitro* to different concentrations of hydrogen peroxide, submitted to unwinding and electrophoresis at different alkalinity and different voltages. To assess the genotoxic potential of BNF, fish were exposed *in vivo* to 1ppm and 5ppm of BNF for 24, 48 and 72 hours. Controls were exposed to sea water only and sea water plus DMSO, used as carrier. Blood cells were collected, submitted to alkaline version of comet assay at pH>13 and silver stained. Comets were analyzed by visual methods including Damage Index, Percentage of Damage and Frequency of Damage, and by *ScionImage* image analysis system. *In vitro* expositions of erythrocytes to H₂O₂ resulted in dose-response relationship, at pH 12,6 and pH>13, indicating applicability of the assay to blood cells of fat snook. *In vivo* exposure to BNF showed a slight tendency towards a higher Damage Index, though not statistically significant, in exposed groups as compared to controls. Wide amplitude of variations of data, in the controls as well as in other experimental groups, made their analysis and interpretation difficult.

Key words: Comet assay, genotoxicity, DNA damage, fat snook, β -naphthoflavone

RESUMO

O Ensaio Cometa (Eletroforese em Gel de Célula Única) foi aplicado ao estudo do potencial genotóxico da β -naftoflavona (BNF) em exposição *in vivo* a eritrócitos de robalos, *Centropomus parallelus*. Condições específicas para o ensaio cometa de células de sangue de robalos foram estabelecidas com base em informações obtidas em literatura; e através de experimentos com exposição *in vitro* a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, e com desenrolamento e eletroforese em diferentes alcalinidades e voltagens. Para avaliar o potencial genotóxico da BNF, os peixes foram expostos a 1ppm e 5ppm de BNF por 24, 48 e 72 horas. Controles foram mantidos em água do mar e em água do mar com DMSO, utilizado com solvente. Células de sangue foram coletadas, submetidas a ensaio cometa em versão alcalina de $\text{pH} > 13$ e coradas por prata. Os cometas foram analisados por métodos visuais, incluindo Índice de Danos, Porcentagem de Danos e Frequência de Danos, e através do sistema de análise de imagem *ScionImage*. Exposições *in vitro* de eritrócitos a H_2O_2 resultaram em relação dose-resposta em $\text{pH} 12,6$ e $\text{pH} > 13$, indicando aplicabilidade do ensaio a células de sangue de robalos. Exposições *in vivo* a BNF indicaram tendência a maior Índice de Danos em grupos expostos comparados a controles, porém não ocorreu diferença significativa estatisticamente. A grande amplitude de variação dos dados, em controles e nos demais grupos experimentais, dificultou sua análise e interpretação.

Palavras-chave: Ensaio Cometa, genotoxicidade, dano ao DNA, robalo, β -naftoflavona

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Indivíduos de Lote 1 em cada condição experimental
- Tabela 2 - Indivíduos de Lote 2 em cada condição experimental
- Tabela 1 - Revisão de trabalhos que utilizaram exposição *in vitro* de animais aquáticos a H₂O₂
- Tabela 4 - Porcentagem de células lisadas e não lisadas
- Tabela 5 - Frequência de Danos em pH 12,6, 12,7 e 12,8
- Tabela 6 - Parâmetros obtidos com uso de sistema de análise de imagem, pH 12,6
- Tabela 7 - Parâmetros obtidos com uso de sistema de análise de imagem, pH > 13
- Tabela 8 - Siglas utilizadas para condições experimentais de peixes de Lote 1
- Tabela 9 - Siglas utilizadas para condições experimentais de peixes de Lote 2
- Tabela 10 - Porcentagem de Danos e Frequência de Danos de peixes expostos a BNF

Lista de Figuras

- Figura 1 - Robalo, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860).
- Figura 2 - Classes para análise de células por escore visual.
- Figura 3 - Experimento para adequação do sistema de análise de imagem.
- Figura 4 - Avaliação do período de incubação em solução de lise.
- Figura 5 - Avaliação do período do tratamento alcalino para desenrolamento do DNA.
- Figura 6 - Efeitos da voltagem de eletroforese sobre cometas.
- Figura 7 - Efeitos do pH da solução alcalina para desenrolamento e eletroforese.
- Figura 8 - Efeitos do pH de solução alcalina para desenrolamento e eletroforese: intensidade média do cometa (A) e intensidade média da cabeça (B).
- Figura 9 - Efeitos do pH de solução alcalina para desenrolamento e eletroforese: intensidade média da cauda (A) e porcentagem de DNA migrado (B).
- Figura 10 - Efeitos do período de eletroforese sobre cometas.
- Figura 11 - Efeitos do pH 12,6 em desenrolamento e eletroforese.
- Figura 12 - Efeitos do pH > 13 em desenrolamento e eletroforese.
- Figura 13 - Variação de Índice de Danos de grupos expostos a BNF durante diferentes períodos de exposição.
- Figura 14 - Tendência de variação de Índice de Danos em função de concentração de BNF e de tempo de exposição.
- Figura 15 - Variação de Índice de Danos de grupos expostos às mesmas concentrações de BNF em diferentes tempos de exposição.
- Figura 16 - Comparação de Índice de Danos de grupos controles em água, formados por peixes do Lote 1 e peixes do Lote 2.
- Figura 17 - Diferenças de Índices de Danos em peixes de Lote 2, mantidos em água ou em DMSO durante 24, 48 e 72 horas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 Coleta e manutenção de animais	8
3.2 Coleta de sangue e obtenção de suspensão celular	9
3.3 Exposição <i>in vitro</i> a peróxido de hidrogênio	9
3.4 Ensaio Cometa	11
3.5 Coloração por prata	14
3.6 Análise de cometas	15
3.7 Análise estatística	17
3.8 Experimentos para estabelecer condições do Ensaio Cometa	18
3.9 Avaliação de danos por exposição <i>in vivo</i> à BNF	22
4. RESULTADOS	25
4.1 Adequação do sistema de análise de imagem	25
4.2 Efeitos do período de incubação em solução de lise	25
4.3 Efeitos do período do desenrolamento do DNA	26
4.4 Efeitos da voltagem de eletroforese sobre cometas	27
4.5 Efeitos do pH de solução alcalina para desenrolamento e eletroforese	28
4.6 Efeitos do período de eletroforese	29
4.7 Efeitos do pH de desenrolamento e eletroforese	30
4.8 Experimento para avaliação do potencial genotóxico da BNF	32

5. DISCUSSÃO	35
5.1 Uso de eritrócitos de <i>Centropomus parallelus</i> em Ensaio Cometa	35
5.2 Uso de H ₂ O ₂ como agente genotóxico	35
5.3. Experimentos para estabelecer as condições para Ensaio Cometa	36
5.4 Experimentos para avaliação do potencial genotóxico da BNF	45
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
TABELAS	61
FIGURAS	67
ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

Os oceanos compreendem grande diversidade de ambientes e de relações biológicas, constituindo sistema dinâmico e complexo. Há décadas, porém, atividades humanas vêm interferindo de modo cada vez mais intenso em processos oceânicos, como através dos múltiplos resíduos que lhes são agregados, levando à poluição marinha e a efeitos deletérios sobre os organismos. Dentre as alterações bioquímicas causadas em seres vivos, destaca-se o potencial genotóxico de diversos poluentes.

Os agentes genotóxicos são caracterizados por possuírem atividade biológica primária, própria ou de metabólitos, capaz de alterar informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando a exposição a um agente tóxico leva à alteração da estrutura ou do conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da seqüência de pares de bases do DNA (mutagenicidade) (McGregor, 2000).

Efeitos genotóxicos podem ocorrer frente a concentrações muito baixas de substâncias, podendo afetar a reprodução, vida embrionária, desenvolvimento, crescimento e sobrevivência de organismos, assim como ter relação com carcinogênese, defeitos hereditários por mutações, teratogênese e patologias de fundo genético (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Mitchelmore & Chipman, 1998; Lee & Steinert, 2003). Diversos poluentes são genotóxicos, dentre eles o petróleo e alguns dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que o compõem (Walker *et al.*, 2001; Pedrozo *et al.*, 2002).

O Ensaio 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. Possui custo relativamente baixo, rapidez, precisão e reprodutibilidade (Belpaeme *et al.*, 1998). Qualquer tipo celular pode ser avaliado, bastando que haja presença de núcleo, e uma característica importante do ensaio é a de precisar de apenas pequena quantidade de células. O desenvolvimento da técnica se deve principalmente aos trabalhos de Östling e Johanson (1984), pela metodologia de eletroforese do DNA em micro-gel; e de Singh e colaboradores (1988), que lhe atribuíram maior sensibilidade através do uso de solução alcalina.

As células submetidas ao Ensaio Cometa são incluídas em gel de agarose e dispostas em fina camada sobre lâminas histológicas. Através de soluções apropriadas, as membranas da célula, núcleo e organelas são rompidas; os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares são retirados; e o material genético restante é submetido a eletroforese. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido do anodo; quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Após coloração, observam-se as preparações em microscópio óptico comum, e o DNA danificado de uma célula individual revela-se com forma similar a de um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram. O dano pode ser quantificado em células individuais, permitindo avaliar o potencial genotóxico de amostras ou de condições ambientais alteradas.

Tradicionalmente, a coloração do material é feita com brometo de etídio e analisada por fluorescência, tendo intensidade proporcional à quantidade de DNA presente. No entanto, essa coloração apresenta alguns fatores negativos, como ação mutagênica do corante, necessidade de equipamentos específicos para análise e curta durabilidade da coloração. Assim, mais recentemente, a coloração por prata vem sendo utilizada como uma boa alternativa para o ensaio, demonstrando alta sensibilidade quando comparada à

coloração por brometo de etídio (Reinhardt-Poulin *et al.*, 2000). Algumas 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 fidedignos.

Em estudos *in vivo*, o Ensaio Cometa pode indicar efeitos genotóxicos em teleósteos pela exposição a substâncias de diferentes classes e mecanismos de ação. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) destacam-se pela sua ubiquidade no ambiente, associada a fontes difusas de poluição crônica, e pela intensidade dos efeitos que provocam. De um modo geral, HAPs apresentam efeitos genotóxicos relacionados a metabólitos formados no próprio organismo que sofreu exposição, em processo que envolve a indução de enzimas da fase I como o citocromo P450. A β -naftoflavona (BNF) é uma substância sintética que mimetiza efeitos de HAPs em organismos, com grande poder de indução de P450, sendo utilizada principalmente em estudos enzimáticos e de desintoxicação. Mais recentemente, a BNF vem sendo avaliada quanto ao seu potencial genotóxico em teleósteos, tendo sido indicado em *Anguilla anguilla* (Pacheco & Santos, 1997; 2002; Nigro *et al.*, 2002) e *Dicentrarchus labrax* (Gravato & Santos, 2002; Teles *et al.*, 2004).

O Ensaio Cometa vem sendo cada vez mais utilizado como teste de genotoxicidade para o biomonitoramento de exposições ocupacionais e ambientais (Moller, 2006). Em estudos ambientais, este ensaio mostrou-se medida fidedigna de genotoxicidade no ambiente aquático (Kamer & Rinkevich, 2002; Lee & Steinert, *op. cit.*), e sua aplicação foi bem sucedida em diferentes espécies de teleósteos (Nigro *et al.*, *op. cit.*; Akcha *et al.*,

2004; Frenzilli *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2004; Lemos *et al.*, 2005). Estudos em peixes apresentam a vantagem de estes organismos possuírem eritrócitos tanto imaturos quanto maduros nucleados, havendo grande facilidade de obtenção de suspensão celular numerosa e de qualidade com a coleta de pequena quantidade de sangue, não sendo necessário causar danos adicionais evidentes aos indivíduos.

Existe um crescente interesse no uso de bioindicadores para estudar efeitos de poluentes aquáticos em nível genômico. Os teleósteos respondem a substâncias genotóxicas de modo similar a outros vertebrados, indicando a distribuição de contaminantes no ambiente e seus efeitos sobre os organismos (Al-Sabti & Metcalfe, *op. cit.*). Ainda, podem desenvolver bioacumulação, e de modo geral apresentam boa resposta a agentes mutagênicos, mesmo em baixas concentrações, e a poluentes (Goksoyr *et al.*, *apud* Russo *et al.*, 2004).

Em diversas regiões estuarinas que são intensamente impactadas, ocorrem efeitos adversos diretos à fauna, adicionais ao estresse natural do sistema (Moyle & Cech, 1988). Peixes ligados a estuários, que têm papel fundamental no transporte de energia e de nutrientes entre a costa e águas interiores, colaboram do mesmo modo com o transporte de poluentes, por bioacumulação e biomagnificação, e podem se tornar tóxicos para consumo humano.

Para este estudo, escolheu-se o teleósteo *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), popularmente conhecido como robalo. O robalo possui hábitos costeiros, ocorrendo do sul da Flórida nos Estados Unidos até o sudeste do Brasil (Rivas, 1986), em regiões lagunares e estuarinas e penetrando em água doce (Figueiredo & Menezes, 1980). Dependendo do estágio do ciclo de vida, há variação da dieta, que consiste de

crustáceos, poliquetas, insetos e peixes (McMichael & Parsons, 1989; Aliaume *et al.*, 1997); e também dos habitats utilizados, havendo adaptações fisiológicas e comportamentais de acordo com a idade do peixe (Gilmore *et al.*, 1983; Peterson & Gilmore Jr., 1991; Peters *et al.*, 1998). É hermafrodita protândrico, atingindo a maturidade sexual com cerca de 200 mm de comprimento (Taylor *et al.*, 2000). A desova ocorre junto à desembocadura de rios ou no mar (Peters *et al.*, *op. cit.*). Destacam-se ainda sua grande importância comercial como pescado e grande potencial para aqüicultura (Bórquez & Cerqueira, 1998; Temple *et al.*, 2004).

A aplicação do ensaio cometa a eritrócitos de espécies brasileiras de teleósteos vem sendo realizada com sucesso, como em Lemos e colaboradores (2005) para avaliação ambiental, e em Andrade e colaboradores (2004) em estudo *in vitro* para avaliação de potencial para biomonitoramento. Porém, não foram encontrados trabalhos com exposição de teleósteos brasileiros à BNF ou estudos que utilizem o ensaio junto a *Centropomus parallelus*.

No laboratório ao qual se vincula este trabalho, desenvolve-se o projeto “Rede 2 - Monitoramento de Impacto Ambiental na Baía do Almirantado, Antártica”, no âmbito do Programa Antártico Brasileiro, que estuda impactos causados pela atividade humana ao redor da Estação Antártica Brasileira “Comandante Ferraz”. Peixes e outros animais marinhos são utilizados como bioindicadores para monitorar variações ambientais, através da atividade de enzimas monooxigenases, Ensaio de Micronúcleo e Ensaio Cometa.

O projeto “Diferenças interespecíficas de danos ao DNA e formação de micronúcleos causados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em organismos costeiros”, com financiamento do CNPq, que teve início em agosto de 2005 e com

vigência de dois anos, vem sendo desenvolvido pelo laboratório aplicando algas unicelulares, invertebrados e o próprio *Centropomus parallelus* em estudos de genotoxicidade empregando o Ensaio de Micronúcleo e Ensaio Cometa.

2. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivos: (1) estudar experimentalmente os efeitos dos principais parâmetros e etapas do Ensaio Cometa sobre células sanguíneas de robalo, *Centropomus paralellus*, estabelecendo condições adequadas para a análise de danos ao DNA destas células; e (2) aplicar tais condições para estudar os efeitos genotóxicos da β -naftoflavona em indivíduos desta espécie, expostos *in vivo* à substância por diferentes tempos de exposição e em diferentes concentrações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E MANUTENÇÃO DE ANIMAIS

Peixes jovens da espécie *Centropomus parallelus* (Figura 1) foram capturados, conforme descrito em Rocha e colaboradores (2005), na região do Sistema Estuarino-Lagunar de Cananéia-SP, próximo à Base de Pesquisa “Dr. João Paiva de Carvalho” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP), e transportados para a Base de Pesquisa “Clarimundo de Jesus” em Ubatuba-SP. Os peixes foram mantidos em tanques de 500 litros, dentro de galpão, em água bombeada da baía em frente da base, de salinidade 32 a 34. Os animais foram alimentados com pedaços de peixes marinhos. Foram feitas higienização e renovação parcial de água três vezes por semana. Foram utilizados peixes de dois lotes, capturados em duas coletas distintas. Peixes do Lote 1, de comprimento total $213,89 \pm 58,54$ mm, foram mantidos na base por 44 meses (Tabela 1); peixes do Lote 2, de comprimento $78,73 \pm 7,66$ mm, foram mantidos por 45 dias antes de serem utilizados (Tabela 2).

Os testes com exposição *in vitro* foram realizados no IO-USP em São Paulo, utilizando indivíduos que foram transportados da Base de Pesquisa de Ubatuba para o IO-USP. Os animais foram mantidos em baldes de cem litros, dois indivíduos por recipiente, em água do mar trazida de Ubatuba, com aeração, em sala com temperatura de 18 a 20°C. Foram alimentados com pedaços de peixes marinhos obtidos comercialmente. A limpeza e troca parcial de água foram feitas três vezes por semana.

3.2 COLETA DE SANGUE E OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO CELULAR

Para a coleta, cada indivíduo foi retirado da água e imediatamente envolto em pano de tecido de algodão umedecido em água. O sistema circulatório foi acessado através do Ducto de Cuvier, ou veia cardinal comum, vaso formado pela fusão das veias cardinais anteriores e posteriores, e que por sua vez desemboca no seio venoso. Para inspeção do ducto e inserção da agulha, o opérculo foi mantido levemente aberto. Foram utilizadas agulhas e seringas de insulina de 1 ml de volume. Não foi feito uso de anestésico. Para as coletas de sangue destinado aos experimentos *in vitro*, alguns animais forneceram sangue mais de uma vez, por até duas ou três vezes. Para tanto, o período mínimo de intervalo entre a primeira e a segunda coleta foi de quatro semanas, e entre a segunda e a terceira coleta foi de seis semanas.

Imediatamente após a coleta, o sangue foi diluído em PBS (Serva, livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7,6) refrigerado na proporção de 1:1000, obtendo suspensão celular eritrocitária. A viabilidade celular foi verificada pelo teste de exclusão de trypan blue. A suspensão eritrocitária foi diluída em solução de trypan blue 0,4% na proporção 1:1, e observada em microscópio óptico comum após 5 minutos. As células viáveis mantêm-se pálidas, enquanto que as inviáveis incorporam o corante. Foi feita contagem, e foi considerada adequada a suspensão com viabilidade maior que 70%.

3.3 EXPOSIÇÃO *IN VITRO* A PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , foi escolhido como substância genotóxica padrão para os experimentos de adaptação metodológica. Em testes de genotoxicidade *in vitro*, as concentrações ideais devem causar efeito tóxico ao DNA e mínima ou nenhuma citotoxicidade, pois haveria interferência nos resultados pelo próprio comprometimento

celular. Foi feito levantamento bibliográfico preliminar para escolha das concentrações a serem aplicadas, e as características gerais dos testes estão indicadas na Tabela 3.

O peróxido de hidrogênio foi diluído em PBS até concentrações adequadas às exposições, a partir de solução de peróxido de hidrogênio (Merck, 30% H₂O₂). Para os experimentos, foram utilizadas concentrações de 1 a 200 µM H₂O₂, optando-se pelo padrão molar para maior possibilidade de identificação da relação dose-resposta em exposição *in vitro*.

A exposição ao H₂O₂ foi feita de duas maneiras: em células em suspensão em PBS ou em células já incluídas em agarose, em lâmina padrão do Ensaio Cometa. Durante este trabalho aplicou-se, em experimentos preliminares, o método de exposição de células em suspensão em PBS, adotando-se posteriormente, como padrão, a exposição de células já incluídas em agarose, correspondendo aos resultados apresentados.

No primeiro método, a suspensão celular foi acondicionada em tubo de 1,5 ml e recebeu solução de peróxido de hidrogênio em PBS, até atingir a concentração desejada. Células controles receberam o mesmo volume de PBS. Os tubos foram cobertos com papel laminado para proteção do UV. O período de exposição ocorreu ao abrigo da luz e sob refrigeração em 5°C. Ao término, foi feita centrifugação em 3000 rpm por 10 minutos, remoção de sobrenadante e ressuspensão em PBS, encaminhando para inclusão em agarose para o Ensaio Cometa.

No segundo método, células já incluídas em agarose LMP 1%, conforme detalhado adiante, foram expostas às diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio dissolvido em PBS. Lâminas controles receberam o mesmo volume de PBS. Cada lâmina recebeu 200 µl de solução, e foi coberta com lamínula. A incubação ocorreu no

escuro, em temperatura de 5°C. Após os períodos determinados, para finalizar a exposição, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram lavadas por três vezes com 200 µl de PBS.

A temperatura ambiental do laboratório foi mantida em 20 a 25°C. Etapas envolvendo suspensões celulares e procedimentos do Ensaio Cometa foram realizadas no interior de balcão refrigerado, com temperatura mantida de 4 a 5°C, ou sobre gelo. Diversas soluções foram utilizadas refrigeradas.

Ao longo dos procedimentos envolvendo material celular, a iluminação natural e de lâmpadas fluorescentes foi evitada. Os vidros de janelas, de visores de portas e do balcão refrigerado foram cobertos com insulfilme que, de acordo com o fabricante, filtra 98% de raios ultravioleta. Quando necessário, foram utilizadas lâmpadas de luz amarela.

3.4 ENSAIO COMETA

O Ensaio Cometa foi realizado em condições alcalinas, com pH>13 ou ajustado para 12,6, 12,7 e 12,8. O protocolo utilizado baseia-se em Singh e colaboradores (1988), com as adaptações sugeridas por Dhawan e colaboradores (2004). O ajuste de pH foi feito com HCl concentrado. O preparo das soluções indicadas está descrito no Anexo A.

Para este trabalho, todas as células que tenham sido submetidas ao ensaio completo foram denominadas de cometas, independente do grau de dano e da ocorrência de cauda. As etapas sucessivas do ensaio são descritas a seguir.

Lâminas histológicas lisas de extremidade fosca foram lavadas com Extran 10% com esponja macia de uso exclusivo, imersas nessa solução por no mínimo 4 horas,

lavadas com água e enxaguadas com água de torneira e água destilada. Foram então imersas em álcool etílico por mínimo 4 horas, secas com lenços de papel e deixadas ao ar por alguns minutos para secarem totalmente.

Foram utilizados dois tipos de agarose, ambas da marca Sigma, e para ambas a dissolução foi feita com uso de chapa com aquecimento, até ebulição e total dissolução. A agarose de ponto de fusão normal (normal melting point ou NMP) foi dissolvida em água e aplicada para compor a primeira camada de agarose. Como apresenta endurecimento total por volta de 37° C, foi mantida em banho-maria em cerca de 60° C para seu uso. A agarose de baixo ponto de fusão (low melting point ou LMP) foi dissolvida em PBS. Como permanece líquida até cerca de 36° C, possibilita manipular células íntegras sem danos por temperatura excessiva, e foi utilizada para compor a segunda camada que contém as células.

Para fazer a primeira camada de agarose, cada lâmina foi mantida sobre chapa com leve aquecimento. Cerca de 200 µl de agarose NMP 1,5% foram dispostos sobre a lâmina, e espalhados ao longo do comprimento com auxílio de lâmina lapidada, em fina camada, como num esfregaço. As lâminas foram deixadas secando sobre superfície totalmente horizontal, em temperatura ambiente, até o dia seguinte. A primeira camada é necessária como base para melhor adesão da segunda camada na lâmina.

A inclusão de células em agarose foi feita com suspensão celular obtida pela diluição de sangue em PBS. Desta, 20 µl foram diluídos em 120 µl de agarose LMP 1% a 37° C, chegando a concentração final de 0,83% para fazer a segunda camada. A agarose foi adicionada sobre lâmina já com a primeira camada, cobrindo com lamínula 24X60 mm. Após endurecimento por cerca de 20 minutos a 5°C, a lamínula foi retirada, passando à etapa de lise.

As lâminas foram dispostas em cubeta vertical, cobertas com solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10; Triton X-100 1% e DMSO 10% adicionados logo antes do uso) e mantidas imersas a 5°C por no mínimo duas horas e no máximo ao longo da noite (cerca de 15 horas). Ao término, as lâminas foram retiradas da solução, o excesso foi limpo com papel toalha e as lâminas foram deixadas inclinadas sobre papel toalha por 5 minutos para que a solução escorresse. Lâminas controles foram imersas em cubeta separada de lâminas expostas ao agente genotóxico *in vitro*, para evitar danos adicionais ao DNA de controles (Dusinska, 2000).

Após a lise, as lâminas passaram para a etapa de desenrolamento do DNA. A solução alcalina (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM), refrigerada a 5°C e recém-preparada, foi utilizada para a etapa de desenrolamento do DNA, com total cobertura das lâminas por 10 minutos. A imersão em solução alcalina pode ser feita diretamente na própria cuba de eletroforese, por cobertura de lâminas já dispostas na posição como para a corrida de eletroforese. Para este método, foi feita rápida lavagem com solução alcalina por três vezes, em período total de cerca de dez segundos, para retirada de excesso de sais de solução de lise. A imersão das lâminas pode ser feita igualmente em cubeta de histologia, com cobertura das lâminas pela solução. Inicialmente, o primeiro método foi aplicado, com padronização posterior para o método de imersão em cubeta.

As lâminas foram, então, submetidas a eletroforese em cuba de 25 cm de distância entre eletrodos. Em geral as condições de eletroforese foram 0,8V/cm (20V), amperagem ajustada para 300mA por aumento ou diminuição do volume da solução alcalina, e tempo de corrida 20 minutos. Estas condições podem variar conforme descrito nos experimentos para adequação da metodologia.

Ao término da eletroforese, as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba. O

excesso de solução alcalina foi retirado com papel absorvente e dispendo-se as lâminas de forma inclinada em uma bandeja por cerca de 3 minutos. A neutralização foi feita com tampão neutro (Tris 0,4 M, pH 7,5), com imersão por 15 minutos seguida por cobertura das lâminas por duas vezes de 5 minutos cada. Entre cada uma destas incubações, as lâminas foram colocadas para secar, inclinadas, por cerca de 5 minutos. Ao final, foram lavadas por três vezes com água destilada, e deixadas inclinadas para secar em temperatura ambiente por 30 minutos.

Após a neutralização, as lâminas foram submetidas a desidratação. Foram cobertas com etanol P.A. por 5 minutos e deixadas para secar em temperatura ambiente por cerca de 1 hora.

3.5 COLORAÇÃO POR PRATA

O processo de coloração com prata utilizado se baseia em Cerda e colaboradores (1997). O preparo das soluções indicadas está descrito no Anexo B.

A fixação dos materiais foi realizada em cubeta vertical. As lâminas foram cobertas por solução de fixação (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5%, glicerol 5%) durante 10 minutos, lavadas por três vezes com água destilada e colocadas para secar em temperatura ambiente até o dia seguinte.

Para a coloração, as lâminas foram re-hidratadas por imersão em cubeta com água destilada por 5 minutos. A solução-trabalho de coloração, preparada imediatamente antes do uso, foi obtida a partir das soluções estoques pré-aquecidas por cerca de 20 minutos em estufa a 60°C. Com auxílio de agitador magnético, 32 ml de solução de carbonato de sódio 5%, vigorosamente agitada, foi misturada com 68 ml de solução de

nitrate de prata (nitrate de amônio 0,02%, nitrate de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%). As lâminas foram imediatamente cobertas pela solução de coloração, e mantidas em estufa a 37°C, ao abrigo da luz, em cubetas envolvidas por papel alumínio, por cerca de 30 minutos, agitando periodicamente. Foi feita troca por solução nova até quando as lâminas atingiram coloração cinzenta ou amarronzada. O ponto ótimo de coloração foi confirmado com rápida observação em microscópio óptico comum. Ao término, foi feita lavagem por três vezes com água destilada.

Para interrupção, as lâminas foram cobertas com solução de ácido acético 1% por 5 minutos, lavadas por três vezes com água destilada e deixadas a secar em temperatura ambiente até o dia seguinte. Após, apresentavam-se prontas para serem conservadas por período prolongado.

3.6 ANÁLISE DE COMETAS

Os cometas a serem analisados foram procurados com base em esquema apresentado no Anexo C, visando analisar diferentes regiões da lâmina e manter a imparcialidade. Medidas junto a margens de lâminas e cometas próximos ou junto a bolhas de ar foram evitados, por serem regiões onde a migração durante a eletroforese pode ocorrer de maneira irregular. Foram analisadas duas lâminas por indivíduo, para exposição *in vivo*, ou para cada condição de exposição *in vitro*; e 50 cometas em cada lâmina, perfazendo 100 cometas por indivíduo ou por condição. Os cometas obtidos foram analisados através de análise visual ou através de sistema de análise de imagem.

Na análise visual, as lâminas foram observadas em microscópio óptico comum, em aumento de 200 vezes. Os cometas obtidos foram classificados em cinco classes de dano, denominadas de Classe 0 a Classe 4. A Classe 0 corresponde aos cometas

considerados intactos, sem danos causados pela exposição; a Classe 1 a cometas com danos mínimos; a Classe 2 a cometas com danos médios; a Classe 3 a cometas com danos intensos; e a Classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos. A Figura 2 ilustra cometas de diferentes níveis de danos utilizados como base para esta classificação. Foram utilizados três índices da análise visual: Porcentagem de Classes de Dano, Índice de Danos e Frequência de Danos conforme descritos por Andrade e colaboradores (*op. cit.*).

A Porcentagem de Classes de Dano foi computada como a porcentagem de ocorrência cada classe (classe 0 a 4) no total de cometas contados:

$$\text{Porcentagem de Classe de Dano} = (n \text{ de determinada classe} \cdot 100) / n \text{ total de cometas}$$

O Índice de Danos (ID) foi calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe (0, 1, 2, 3 e 4):

$$ID \text{ total} = 0.(n \text{ Classe } 0) + 1.(n \text{ Classe } 1) + 2.(n \text{ Classe } 2) + 3.(n \text{ Classe } 3) + 4.(n^{\circ} \text{ Classe } 4)$$

A Frequência de Danos foi calculada como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de cometas contados (n total).

$$\text{Frequência de danos} = [(n \text{ total} - n \text{ Classe } 0) \cdot 100] / n \text{ total}$$

A ficha utilizada para registro de cometas classificados é apresentada no Anexo D. Não foram considerados cometas que apresentaram característica de apoptose ou necrose.

Na análise através de sistema de análise de imagem, foi utilizado o software *ScionImage for Windows*, desenvolvido pela Scion Corporation para utilização em PCs utilizando sistema operacional Windows 95 a XP. Este programa foi baseado no original *NIH Image for MacIntosh*, desenvolvido por Wayne Rasband do National Institute of Health dos Estados Unidos. O macro desenvolvido por Helma e Uhl (2000) para analisar imagens negativas de cometas revelados com fluorescência de alto contraste (cometa branco em fundo preto) foi utilizado com pequena adaptação, para poder analisar imagens positivas com pouco contraste (cometa preto em fundo cinza) de fotografias de cometas corados por prata. Foi necessário inserir o comando “invert” no início do programa, para inverter a figura positiva em figura negativa; e aumentar o nível do “threshold”, para compensar o nível de contraste.

Para cada cometa, o macro gera dados referentes a um total de dezessete parâmetros, dos quais os seguintes foram utilizados para este trabalho: área do cometa; área da cabeça; intensidade média do cometa; intensidade média da cabeça; intensidade média da cauda; comprimento da cauda; altura da cauda; porcentagem de DNA migrado e momento da cauda de Olive, sendo Momento da cauda de Olive = produto da porcentagem de DNA na cauda multiplicado pelo comprimento da cauda (Olive *et al.*, 1992).

Os programas citados foram obtidos em: *ScionImage for Windows* - www.scioncorp.com; *NIH Image for MacIntosh* - www.nih.gov; Macro desenvolvido por Helma e Uhl (2000) - www.predictive-toxicology.org/comet.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney (Zar, 1996).

3.8 EXPERIMENTOS PARA ESTABELEECER CONDIÇÕES DO ENSAIO COMETA

Foram realizados experimentos, com testes *in vitro* em lâminas, para avaliar efeitos dos seguintes principais parâmetros e/ou etapas do protocolo, a fim de estabelecer condições adequadas à aplicação do Ensaio Cometa a eritrócitos de robalo.

3.8.1 Experimento para adequação do sistema de análise de imagem

O sistema de análise foi ajustado para utilização em materiais corados por prata, com base no experimento descrito. Eritrócitos em agarose LMP 1%, foram expostos a 200 μ M H₂O₂ (exposto) ou PBS (controle), lisados, imersos em solução alcalina de pH 12,6 por 10 minutos, e submetidos a eletroforese em 0,8 V/cm, 300mA, por 10 minutos. As lâminas foram neutralizadas e coradas por prata. Foram escolhidas lâminas de coloração ótima, que foram observadas em microscópio óptico comum. Para análise com uso do sistema *ScionImage*, uma mesma célula de condição controle e uma mesma célula de condição exposta foram avaliadas frente a diferentes índices de “threshold”, ajustado na escrita do macro para valores de 50, 60, 70 ou 80. Em cada condição, as células foram analisadas por cinco vezes consecutivas. Foram obtidos dados de dezessete parâmetros, que foram submetidos a análise estatística.

3.8.2 Avaliação do período de incubação em solução de lise

Eritrócitos foram incluídos em 50 ou 100 μ l de agarose LMP de concentrações 0,5% ou 1%. Para todas as lâminas, foi feita terceira camada com 50 μ l de agarose LMP em mesma concentração que a segunda camada. As lâminas foram cobertas com

solução de lise a 5° C por 1 ou por 2 horas, retiradas da solução, lavadas com água destilada, imersas por três vezes de 5 minutos em solução de neutralização e coradas com Giemsa 10% por 20 minutos.

Para cada combinação de condições, foram observadas duas lâminas em microscópio óptico comum. Em aumento de 200 vezes, foi feita análise de 100 células por lâmina, com classificação em dois grupos: células lisadas; ou células não lisadas e parcialmente lisadas. Foram consideradas lisadas as células com conformação radial e de contornos difusos. Eritrócitos com contornos pouco definidos foram considerados parcialmente lisados. Eritrócitos de formato oval nítido, característico de células intactas, foram considerados como não lisados.

3.8.3 Avaliação do período de desenrolamento do DNA

Eritrócitos incluídos em agarose LMP 1% foram expostos a H₂O₂ 100µM (expostas) ou PBS (controles), por 20 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS e imersas em solução de lise por 2 horas a 5° C. Após este período, foram retiradas três lâminas expostas e três controles, lavadas com água destilada, neutralizadas, fixadas, secas ao longo da noite e coradas por método de prata. As demais, após o período de lise, foram lavadas com água destilada e imersas em solução alcalina de pH>13, por períodos de 5 ou 10 minutos, para desenrolamento do DNA. Ao término de cada período, foram retiradas três lâminas, lavadas com água destilada, neutralizadas, fixadas, secas ao longo da noite e coradas por prata.

Foi feita observação das lâminas em microscópio óptico comum, em aumento de 100 a 400 vezes, com análise da morfologia dos materiais celulares e nucleares e da qualidade da coloração por método de prata.

3.8.4 Avaliação de efeitos da voltagem de eletroforese sobre cometas

Eritrócitos incluídos em agarose LMP 1%, não expostos a agente genotóxico, foram imersos em solução de lise a 5°C por 2 a 5 horas. Para cada condição de eletroforese testada, oito lâminas foram retiradas da lise, deixadas inclinadas para saída de excesso de solução, e lavadas rapidamente com solução alcalina pH>13 a 5°C. Em cuba de eletroforese, as lâminas foram imersas por 20 minutos na mesma solução, para desenrolamento do DNA, e submetidas a eletroforese por 20 minutos em 300 mA, com teste de diferentes voltagens.

A voltagem foi acertada por adequação de volume de solução alcalina, mantendo a amperagem em 300 mA. A cuba utilizada possibilitou troca da plataforma de base para lâminas, disponível em diferentes espessuras, permitindo manter a altura de solução sobre as lâminas em cerca de 1 cm. As condições de voltagem testadas e respectivos volumes de solução foram 0,8V/cm; 0,7V/cm; 0,6V/cm; 0,5V/cm; e 0,4V/cm. Ao término, as lâminas foram neutralizadas, coradas por prata e observadas em microscópio óptico comum.

3.8.5 Avaliação de efeitos do período de eletroforese sobre cometas

Eritrócitos incluídos em agarose LMP 1% foram expostos por 30 minutos a 200 µM de peróxido de hidrogênio (exposto) ou PBS (controle). As lâminas foram lavadas com PBS, imersas em solução de lise por 2 horas, lavadas com água destilada e com solução alcalina de pH 12,6. Na mesma solução, foram imersas por 10 minutos para desenrolamento e submetidas a eletroforese em 1 V/cm, 300 mA, por 10, 15, 20 ou 25 minutos. Após cada período, foram retiradas duas lâminas controles e duas expostas, substituídas na cuba por lâminas vazias, sendo neutralizadas e coradas por prata. As

lâminas foram observadas em microscópio óptico comum.

3.8.6 Efeitos do pH da solução alcalina (desenrolamento e eletroforese) sobre cometas

Eritrócitos incluídos em agarose LMP 1% foram expostos por 30 minutos a 200 μ M de peróxido de hidrogênio (expostos) ou a PBS (controles). As lâminas foram lavadas e imersas em solução de lise por 2 a 5 horas. Após este período, foram retiradas, lavadas com água destilada e com solução alcalina de pHs 12,6, 12,7 e 12,8. Na mesma solução, foi feito desenrolamento por 10 minutos, e eletroforese em 0,8 V/cm, 300 mA, por 10 minutos. Ao término, as lâminas foram neutralizadas, coradas por prata e observadas em microscópio óptico comum.

Os resultados deste teste foram analisados com uso de programa de análise de imagem *ScionImage for Windows* e macro desenvolvido por Helma e Uhl (2000), sendo analisadas duas lâminas por condição e 50 células por lâmina.

3.8.7 Efeitos de pH 12,6 e pH>13 da solução alcalina para desenrolamento e eletroforese

Foi feita coleta de sangue de dois indivíduos. O procedimento experimental completo foi realizado do mesmo modo para ambas as amostras coletadas. Eritrócitos incluídos em agarose LMP 1% foram expostos por 30 minutos a peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 10, 25 e 50 μ M H₂O₂ (expostos), a 5°C, ou a PBS (controles). As lâminas foram lavadas e imersas em lise por 2 a 5 horas a 5°C. Após este período foram submetidas ao desenrolamento por 10 minutos em pH 12,6 e pH >13 e subsequentemente a eletroforese por 20 minutos em 0,8V/cm (20V), 300 mA, a 5°C nas mesmas soluções. As lâminas foram neutralizadas, coradas por prata e observadas ao

microscópio óptico comum. Para cada condição de exposição e pH, foram analisadas duas lâminas, e com uso de sistema de análise de imagem foi feita análise de 50 células por lâmina.

3.9 AVALIAÇÃO DE DANOS POR EXPOSIÇÃO *IN VIVO* À BNF

Para avaliar efeitos de genotoxicidade da BNF através do Ensaio Cometa, foram feitos experimentos com exposição *in vivo* de robalos, por diferentes períodos e a diferentes concentrações de BNF.

Para adição à água do mar para as exposições, a BNF (β -naftoflavona, peso molecular 259,26 g/mol) foi primeiramente dissolvida em DMSO (Dimetilsulfóxido), utilizado como solvente neste trabalho. Duas soluções mães foram preparadas, para exposições a BNF 1 ppm (3,86 μ M) e 5 ppm (19,28 μ M). Na primeira, 20 mg de BNF foram dissolvidos em 1 ml de DMSO e na segunda 100 mg de BNF em 1 ml DMSO. Estas soluções foram preparadas em temperatura ambiente, imediatamente antes do início de cada exposição, com uso de agitador magnético. As soluções foram adicionadas em água, chegando às concentrações de BNF desejadas - 1 ppm: 20 mg em 20 litros de água; 5 ppm: 100 mg em 20 litros de água.

Os experimentos de exposição *in vivo* foram realizados na Base de Pesquisa “Clarimundo de Jesus” em Ubatuba. Os animais, mantidos em tanques em galpões, foram transferidos 24 horas antes do início das exposições para o interior de laboratório, local onde foram realizados os testes, com temperatura mantida em 20°C. Neste período prévio e durante os experimentos, os animais foram mantidos em jejum.

Foram separados 12 grupos, cada grupo com 3 a 5 peixes, colocados individualmente em recipientes de plásticos com 20 litros de água para serem mantidos

em condições de exposição. Estas foram resultantes da combinação dos três períodos de exposição (24, 48 e 72 horas), com as concentrações de BNF em DMSO (BNF 1 ppm e BNF 5 ppm), água limpa (controle água) e água com DMSO (controle DMSO). Os animais de grupos controle água e expostos a BNF 1 ppm e 5 ppm, em número total de 60, foram provenientes de peixes do Lote 1.

Devido ao número reduzido de peixes em estoque e a dificuldade de coletar indivíduos de mesmo tamanho, foram utilizados para grupos de controle DMSO indivíduos do Lote 2. Para comparação de respostas a condições experimentais geradas por peixes do Lote 1 e por peixes do Lote 2, foram incluídos mais três grupos de controle água, correspondentes aos períodos de exposição de 24, 48 e 72 horas, utilizando peixes do Lote 2.

Foram utilizados 20 litros de água do mar para cada indivíduo do Lote 1; e foram utilizados 10 litros de água para cada indivíduo do Lote 2. Para fazer a solução de 1 ppm BNF em água, foram adicionadas 0,5 ml da primeira solução de BNF em DMSO (20 mg BNF / ml DMSO) para cada 10 litros da água; para a solução de 5 ppm BNF, foram utilizados 0,5 ml da segunda solução de BNF em DMSO (100 mg BNF / ml DMSO) para cada 10 litros de água. Para controle DMSO, foi adicionado 0,5 ml de DMSO, sem BNF, para cada 10 litros de água. A concentração final de DMSO em cada solução foi de 0,05 ml DMSO / litro de água. Esta concentração de DMSO foi utilizada com sucesso em experimentos com *Anguilla anguilla* (Ahmad *et al.*, 2005; Teles *et al.*, 2003; Pacheco e Santos, 2002). O DMSO puro ou com BNF foi adicionado à água logo antes dos peixes serem colocados em exposição, e foi feita homogeneização com uso de bastão de vidro. Condições de controle água passaram apenas por agitação com bastão de vidro. Ao término de cada período, foi feita coleta de sangue, obtenção de suspensão

celular em PBS, sendo o material submetido ao Ensaio Cometa em pH > 13 conforme protocolo estabelecido. O desenrolamento foi feito por 10 minutos e a eletroforese por 20 minutos, em 20V e 300 mA. Para controle interno do ensaio, foram incluídas lâminas de Controle Positivo, expostas *in vitro* a 100 µM de peróxido de hidrogênio. Foram observadas em microscópio óptico comum duas lâminas por indivíduo, com análise de 50 células por lâmina e classificação por análise visual.

4. RESULTADOS

4.1 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGEM

Eritrócitos expostos a 200 μM H_2O_2 ou PBS foram submetidos ao Ensaio Cometa e avaliados com uso do sistema de análise de imagem *ScionImage* em níveis de “threshold” de 50, 60, 70 e 80. Para os dados de parâmetros fornecidos pelo sistema, as diferenças entre área do cometa; intensidade média do cometa; área da cabeça; intensidade média da cabeça; comprimento da cauda; momento da cauda de Olive; porcentagem de DNA migrado; intensidade média da cauda; e altura da cauda de controles e de expostos, em diferentes “thresholds”, foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Dados referentes às médias, desvio padrão e erro padrão de intensidade média do cometa e comprimento da cauda estão apresentados na Figura 3. Ocorreu redução das medidas de intensidade média dos cometas conforme o “threshold” foi ajustado para menores valores, enquanto medidas de comprimento da cauda não apresentaram tendência claramente relacionada à variação de “threshold”. Sob os diferentes níveis de “threshold”, foi clara a diferença entre controle e exposto para ambos os parâmetros.

4.2 EFEITOS DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO EM SOLUÇÃO DE LISE

Eritrócitos incluídos em 50 ou 100 μl de agarose LMP; 0,5% ou 1%; lisados por 1 ou 2 horas foram analisados e classificados em dois grupos: 1. células lisadas; 2. células não lisadas ou parcialmente lisadas. Foram consideradas como lisadas as células

arredondadas, de conformação radial e contornos difusos. Eritrócitos de formato oval nítido, característico de células intactas, foram considerados como não lisados. Eritrócitos de formato arredondado, porém ainda oval, e contornos com pouca difusão foram considerados parcialmente lisados. As células em diferentes condições de lise são apresentadas na Figura 4 (A e B). As porcentagens de células lisadas e não lisadas em diferentes condições estão na Tabela 4. Nesta tabela, as células parcialmente lisadas ou não lisadas foram considerados como não lisadas.

A maior porcentagem de células não lisadas ocorreu em lâminas com 100 µl de agarose 1% em 1 hora de lise (39%), seguidas de lâminas com as mesmas condições mas com 2 horas de lise (25%) e de lâminas com 100 µl de agarose 0,5% em 1 hora de lise (16%). A maior porcentagem de células lisadas ocorreu em lâminas com 50 µl de agarose 0,5% em 2 horas de lise (3%), seguidas de lâminas com 50 µl de agarose 1% em 2 horas de lise (7%) e lâminas com 100 µl de agarose 0,5% em 2 horas de lise (7%).

4.3 EFEITOS DO PERÍODO DO DESENROLAMENTO DO DNA

Eritrócitos expostos a H₂O₂ 100 µM ou PBS, foram lisados e imersos em solução alcalina de pH>13 por 5 ou 10 minutos, analisados quanto à morfologia de materiais celulares, nucleares e qualidade de coloração.

Foram observadas diferenças ao serem comparadas lâminas submetidas apenas à lise e lâminas submetidas a diferentes períodos de desenrolamento. Porém, não foram observadas diferenças nítidas entre controles PBS e lâminas expostas a peróxido de hidrogênio.

De um modo geral, lâminas submetidas apenas a lise apresentaram células com

amplo halo de difusão ao redor do nucleóide, de medida de raio tendo de 5 a 6 vezes a medida do nucleóide. A coloração do nucleóide e do material difuso foi relativamente intensa (Figura 5A).

Lâminas submetidas a desenrolamento por 5 minutos (Figura 5B) e por 10 minutos (Figura 5C) apresentaram halos de difusão com medida de raio de cerca 3 a 4 vezes ao do nucleóide. A coloração dos nucleóides foi intensa para lâminas dos dois períodos de desenrolamento. Porém, halos de difusão apresentaram coloração de intensidade reduzida em células que passaram por 10 minutos de desenrolamento, quando comparados a materiais de lâminas submetidas apenas a lise e a tratamento alcalino por 5 minutos.

4.4 EFEITOS DA VOLTAGEM DE ELETROFORESE SOBRE COMETAS

Eritrócitos não expostos a agente genotóxico, passaram por lise, desenrolamento e eletroforese em 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8V/cm, 300mA, por 20 minutos, e foram analisados quanto a morfologia de materiais celulares, nucleares e qualidade de coloração.

A Figura 6 mostra diferenças em migração e as alterações da morfologia de cometas em lâminas submetidas a eletroforese em diferentes voltagens.

Em lâminas que passaram por eletroforese em 0,4V/cm, não foi evidenciada migração de material, não havendo conformação típica de cometa. Foi observada difusão de material nuclear, como halo de menor intensidade de coloração ao redor do núcleo. Em 0,5V/cm, os halos de difusão apresentaram-se levemente deslocados, ocorrendo migração por pequena extensão e princípio de formação de cauda. Em

0,6V/cm e em 0,7V/cm, a migração foi mais evidente, com halos deslocados e formando cometas. Em 0,8 V/cm, foi observada a ocorrência de cometas com cauda extensa.

4.5 EFEITOS DO pH DE SOLUÇÃO ALCALINA PARA DESENROLAMENTO E ELETROFORESE

Eritrócitos expostos a H_2O_2 200 μ M ou PBS passaram por desenrolamento e eletroforese (0,8V/cm, 300mA) em soluções alcalinas de pHs 12,6; 12,7 ou 12,8, e foram submetidos a análise visual e análise em sistema de análise de imagem.

A porcentagem de cometas da classe 0 (núcleo intacto) foi menor em expostos do que em controles; e decrescente de acordo com o aumento de pH. O nível de “background”, relacionado à ocorrência de danos em controles, é nulo em pH 12,6 (Frequência de dano = 0), intermediário em 12,7 (Frequência de dano = 78%) e alto em 12,8 (Frequência de dano = 94%). Em pH 12,6 a frequência de dano nas lâminas expostas também é o menor comparando com a de outros pHs testados. A Tabela 5 apresenta a Frequência de Danos para as diferentes condições.

No mesmo pH, cometas de controles apresentaram cabeças mais nítidas e de maior diâmetro, porém caudas menores do que de expostos. Em diferentes pHs, este padrão foi observado em pH 12,6 quando comparado a 12,7 e a 12,8; e em pH 12,7 quando comparado a 12,8. Assim, com o aumento de pH houve diminuição do diâmetro da cabeça e aumento da cauda de cometas. A Figura 7 apresenta fotografias de lâminas das diversas condições.

O sistema de análise de imagem forneceu dados referentes a: área do cometa, área

da cabeça, intensidade média do cometa, intensidade média da cabeça, intensidade média da cauda, comprimento da cauda, momento da cauda de Olive, porcentagem de DNA migrado e altura da cauda. Não foi feita calibração do sistema, e as medidas foram dadas em unidades arbitrárias (U.A.).

A Figura 8 (A e B) e a Figura 9 (A e B) apresentam alguns resultados relacionados a intensidade média do cometa, intensidade média da cabeça, intensidade média da cauda e porcentagem de DNA migrado.

Foi encontrada diferença significativa para a maior parte dos parâmetros, ao comparar controles e expostos de um mesmo pH; controles de diferentes pHs; e expostos de diferentes pHs. A diferença significativa ($p < 0,0005$) foi mais evidente em parâmetros diretamente ligados à intensidade de coloração - intensidade média de cometas, intensidade média de cabeças; intensidade média de caudas; momentos de caudas; % de DNA migrado e na altura da cauda. Na comparação entre controles e expostos a pH 12,8, não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,49$) apenas para o parâmetro área da cabeça. Na comparação entre expostos de diferentes pHs, os comprimentos das caudas foram significativamente diferentes, com $p < 0,05$; e para as demais comparações, as diferenças foram significativas com $p < 0,005$. No mesmo pH, os valores de parâmetros examinados foram maiores em expostos do que em controles e estes valores crescem com o aumento de pH.

4.6 EFEITOS DO PERÍODO DE ELETROFORESE

Eritrócitos expostos a H_2O_2 200 μM ou PBS foram submetidos a desenrolamento por 10 minutos e eletroforese (1V/cm, 300 mA) por 10, 15, 20 ou 25 minutos em pH 12,6 e foram analisados em relação a variações da morfologia de cometas. Os resultados

são apresentados na Figura 10.

Em 10 minutos de eletroforese (Figura 10A), cometas de controles apresentaram cabeça maior e mais nítida de que a de expostos, e cauda arredondada com tênue ligação à cabeça, de morfologia semelhante a halo de difusão deslocado. Lâminas expostas apresentaram cometas com cabeça de menor diâmetro, cauda mais intensa e maior deslocamento de material.

Em 15 minutos de eletroforese (Fig. 10B), cometas de expostos apresentaram cauda mais longa e cabeça de menor diâmetro que cometas de controles. Em relação ao tempo de corrida de 10 minutos, para ambas as condições as caudas foram mais longas e as cabeças de diâmetro diminuído.

Em 20 minutos de eletroforese (Fig. 10C), tanto cometas de controles quanto de expostos apresentaram migração extensa. Controles passaram a apresentar cauda com ligação mais nítida à cabeça. Em ambos, a coloração das caudas foi menos intensa que lâminas dos tempos anteriores.

Em 25 minutos de eletroforese (Fig. 10D), o padrão descrito acima se intensificou, com caudas mais longas. Cometas de controles ocorreram com cauda muito longa, em padrão que poderia ser interpretado como tendo sido gerado por intensa quebra de DNA por efeito de agente genotóxico. Cometas de expostos apresentam cabeça muito pequena, cauda muito longa e de coloração muito fraca. Em regiões de intensa concentração celular de lâminas expostas, os cometas foram visualizados como pequenos pontos, e o material da cauda foi pouco distinguível da coloração de fundo.

4.7 EFEITOS DO pH DE DESENROLAMENTO E DE ELETROFORESE

Eritrócitos expostos a 10, 25 e 50 μM H_2O_2 ou a PBS foram submetidos a desenrolamento por 10 minutos e eletroforese (0,8V/cm, 300 mA) por 20 minutos em pH 12,6 ou pH >13 e analisadas com uso de sistema de análise de imagem.

No mesmo pH, cometas de controles apresentaram cabeças mais nítidas e de maior diâmetro e caudas menores do que de expostos. Em diferentes pHs, este padrão foi observado em pH 12,6 quando comparado a pH >13, com diminuição do diâmetro de cabeça dos cometas e aumento de comprimento da cauda conforme aumento de pH. A proporção de cometas não afetados foi menor em expostos do que em controles. A proporção ficou menor com o aumento do pH.

Os dados de parâmetros obtidos através de sistema de análise de imagem, apresentados em unidades arbitrárias (U.A.), são apresentados na Tabela 6 (dados de pH 12,6), Tabela 7 (dados de pH > 13). As Figuras 11 e 12 apresentam valores de intensidade média de cometas e intensidade média de caudas em pH 12,6 e pH > 13.

Entre controles e expostos de um mesmo pH, diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,000$) foram encontradas em todos os parâmetros. Entre controles de diferentes pHs, houve diferenças significativas ($p = 0,000$) para todos os parâmetros, exceto o comprimento da cauda e a altura da cauda. Entre expostos de cada pH, ocorreram diferenças significativas para a maior parte dos parâmetros. Em pH 12,6, não houve diferença significativa apenas para área da cabeça, em todas as comparações. Em pH > 13, não houve diferença significativa para área da cabeça, comparando-se 25 μM e 50 μM ; e para comprimento da cauda, comparando-se 50 μM a 10 e a 25 μM .

As diferenças foram mais evidentes em parâmetros diretamente ligados à intensidade de coloração, tais como intensidade média de cometa; intensidade média de

cabeça; intensidade média de cauda; momento da cauda; porcentagem de DNA migrado, e na altura da cauda. Estes parâmetros apresentam maiores valores em exposto do que em controle de um mesmo pH; e crescentes de acordo com o aumento do pH.

4.8 EXPERIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DA BNF

A Tabela 8 e a Tabela 9 apresentam os códigos utilizados para indicar as condições de exposição dos experimentos *in vivo*.

4.8.1. Variação do Índice de Danos em função de concentração de BNF e de tempo de exposição

As variações do Índice de Danos em função da concentração de BNF (0, 1 ppm e 5 ppm) e tempo de exposição (24, 48 e 72 horas) estão na Figura 13. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre Índice de Danos de diferentes grupos experimentais, exceto entre controle positivo (Cpos) e demais grupos experimentais ($p = 0,006$ a $0,033$).

A análise de dados dos grupos expostos às diferentes concentrações de BNF durante o mesmo período (24 ou 48 ou 72 horas) indica que o Índice de Danos de todos os grupos expostos a BNF apresentaram tendência geral de aumento, porém não houve diferença significativa em função de concentrações de BNF. Os grupos de 24 (Figura 14A) e 48 horas (Figura 14B) demonstram um maior aumento no intervalo de 0 a 1 ppm BNF, chegando a platô no intervalo de 1 a 5 ppm BNF. O grupo de 72 horas (Figura

14C) demonstrou tendência de aumento contínuo para os dois intervalos de concentração.

A análise de dados de grupos expostos a uma mesma concentração de BNF (1 ou 5 ppm) em diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 horas) sugere vaga indicação de que a exposição à concentração de 1 ppm BNF (nas figuras: B124, B148 e B172) durante diferentes períodos não resultou em aumento de Índice de Danos; já na concentração mais alta (5 ppm BNF), o maior período de exposição pode contribuir para aumento de Índice de Danos (Figura 15).

4.8.2 Comparação de Índices de Danos de controles água de peixes do Lote 1 e Lote 2

A Figura 16 mostra a diferença entre o Índice de Danos em grupos de controle água, constituídos de peixes do Lote 1 (CA) e do Lote 2 (C), durante 24, 48 e 72 horas. De modo geral, os Índices de Danos em peixes do Lote 1 são maiores de que de peixes do Lote 2. A diferença entre controles água 24 horas do Lote 1 (CA24) e do Lote 2 (C24), assim como a diferença entre CA72 e C72 são significativas, com $p = 0,033$ para ambas. Estes resultados indicam que as respostas de peixes de cada lote à mesma condição experimental - manutenção em recipiente com água do mar durante um mesmo período - são diferentes. A mesma diferença pode ocorrer em outros grupos, razão pela qual não foram utilizados os controles DMSO do Lote 2 para comparação junto ao experimento com peixes do Lote 1.

4.8.3 Efeitos de DMSO

As diferenças em Índice de Danos de grupos controles água e controles DMSO de peixes do Lote 2 estão na Figura 17. A exposição a DMSO durante 24 e 72 horas

aumentou o Índice de Danos em relação ao de controles água, apesar de que somente a diferença no grupo de 72 horas é estatisticamente significativa ($p = 0,020$). Ao contrário, a exposição durante 48 horas diminui significativamente ($p = 0,020$) o Índice de Danos em controles DMSO.

A grande amplitude de variação de Índice de Danos, tanto de controles água como de controles DMSO não permite uma conclusão sobre efeitos do DMSO. A causa da variação não é conhecida, mas, em parte é devida a variação de Índice de Danos dos grupos expostos a água e dos grupos expostos a DMSO.

5. DISCUSSÃO

5.1 USO DE ERITRÓCITOS DE *Centropomus parallelus* EM ENSAIO COMETA

A aplicação de células de sangue de teleósteos em Ensaio Cometa requer pequeno volume de amostra, obtida por método não-destrutivo. Hoffmann e Lommel (1984) já haviam registrado a possibilidade de obter amostras repetidas de sangue de teleósteos, sendo o Ducto de Cuvier uma das possíveis vias de acesso. Nacci e colaboradores (1996) destacaram que estudos com teleósteos, que podem fornecer diversas amostras de sangue ao longo do tempo, possibilitam monitorar modificações em danos ao DNA e demais efeitos simultâneos.

Indivíduos da espécie *Centropomus parallelus* que forneceram sangue para procedimentos experimentais, com acesso através do Ducto de Cuvier, não apresentaram comprometimento evidente da sanidade, o que possibilita a realização de estudos que requeiram repetidas obtenções de amostras de sangue de um mesmo animal. Deve-se porém considerar o intervalo necessário para a recuperação, de acordo com o objetivo experimental.

5.2 USO DE H₂O₂ COMO AGENTE GENOTÓXICO

O peróxido de hidrogênio é comumente utilizado como substância genotóxica padrão em exposições *in vitro*. Relaciona-se à ocorrência de danos oxidativos ao DNA, que compreendem danos a bases e grupos de açúcar-fosfato; e quebras de fita dupla e de fita simples. A exposição do DNA a estresse oxidativo leva a mais de 20 tipos de danos de bases de nitrogênio (Slupphaug *et al.*, 2003).

Considera-se que o Peróxido de Hidrogênio causa quebras de fita do DNA por gerar o radical hidroxila (OH*) próximo a uma molécula de DNA, através da reação de Fenton: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^* + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ (Ciereszko *et al.*, 2005). Assim, o H_2O_2 não interfere diretamente com o DNA, sendo convertido para o radical hidroxila através de reação de Fenton catalisada por íon metálico, como Fe^{2+} ou o Cu^{2+} (Cotelle & Féraud, 1999).

As concentrações escolhidas de H_2O_2 , entre 10 a 200 μM , estão de acordo com diversas publicações. A exposição a H_2O_2 de células já incluídas em agarose tinha sido feita com sucesso em linfócitos de humanos (Singh *et al.*, 1988) e hepatócitos de peixes (Devaux *et al.*, 1997).

5.3 EXPERIMENTOS PARA ESTABELEECER AS CONDIÇÕES PARA ENSAIO COMETA

Os experimentos realizados com testes *in vitro* possibilitaram avaliar efeitos de variações de parâmetros do ensaio, levando ao estabelecimento de condições para a aplicação do Ensaio Cometa a eritrócitos de robalo.

5.3.1 Adequação de montagem de lâminas e etapa de lise

O volume e concentração de gel de agarose LMP são importantes para compor uma segunda camada de qualidade e que permaneça estável ao longo do ensaio, além de sua padronização ser fundamental para a comparação de resultados. De um modo geral, publicações relatam concentrações de agarose LMP entre 0,5 a 1%, e para este trabalho a concentração padrão escolhida foi de 0,83%. Em nosso laboratório, a composição de segunda camada com uso de lamínula 24 X 60 mm, sobre volume de 120 μl de agarose,

produziu lâminas homogêneas, de fácil manipulação e estáveis ao longo do ensaio, sendo escolhido como padrão. Para a solução de lise, escolheu-se protocolo de preparo que inclui DMSO 10%, recomendado para prevenir danos ao DNA por liberação de ferro de eritrócitos lisados (Tice *et al.*, 1991 *apud* Tice *et al.*, 2000). A imersão das lâminas foi sempre realizada em cubetas de vidro, considerando que foi registrado comprometimento de lâminas armazenadas em recipientes de plástico, enquanto que manutenção prolongada em recipientes de vidro não afetou a qualidade de materiais (Nacci *et al.*, *op. cit.*).

Resultados do teste realizado para avaliação do período necessário para a lise indicaram relação da efetividade de lise com os fatores: tempo de imersão, concentração da agarose e volume da segunda camada. De um modo geral, lâminas com maior volume de agarose (100 µl) apresentaram maior porcentagem de células não lisadas. Considerou-se como principal fator de interferência para lise a própria penetração da solução na agarose e efetivo contato com as células, já que, mesmo que um maior volume de agarose corresponda a maior número de células a serem rompidas, tem-se sais em excesso e forte detergente (Triton X-100) para atuar sobre os materiais. Para reduzir a resistência à penetração da solução sem afetar a qualidade do gel, optou-se por não fazer a terceira camada de agarose, que poderia ser adicionada apenas para maior proteção do material; e reduzir a concentração de agarose para valor intermediário. Para lâminas produzidas conforme descrito, o período de imersão em lise foi padronizado como mínimo de 2 horas. Em experimentos posteriores, não foram mais observadas células não lisadas. O período de imersão escolhido está de acordo com a quase totalidade de protocolos de Ensaio Cometa, que indicam tempo de lise de no mínimo 1 hora. Alguns trabalhos indicam imersão em solução de lise ao longo da noite (Yendle *et al.*, 1997; Kamer & Rinkevich, *op. cit.*), provavelmente mais por conveniência

experimental, pois a etapa de lise possibilita intervalo de trabalho sem comprometer os resultados. O tempo máximo de manutenção de lâminas em lise sem causar danos adicionais ao DNA ou perda de DNA por difusão depende das condições técnicas de cada laboratório (Tice *et al.*, *op. cit.*). Porém, Nacci *et al.* (*op. cit.*), em ensaio com células de invertebrados aquáticos, armazenaram lâminas a 4°C por períodos que variaram de 1 hora a diversos meses em solução de lise, não observando modificações.

5.3.2 Adequação de tempo de desenrolamento, tempo de eletroforese e voltagem de eletroforese

Foram feitos experimentos para avaliar efeitos sobre a morfologia de cometas causados por alterações de parâmetros do protocolo, sendo: período do tratamento alcalino para desenrolamento do DNA; período de eletroforese; variação de voltagens de eletroforese.

A avaliação da morfologia de eritrócitos submetidos a lise e eritrócitos submetidos a lise e a imersão em solução alcalina de $\text{pH} > 13$ é ilustrada na Figura 5. Ao término da lise (Figura 5A), observa-se área central corada intensamente, circundada por amplo halo que possivelmente consiste de fragmentos de membranas rompidas, que mesmo em intenso processo de difusão, ainda se mantinham na agarose. Após imersão em solução alcalina por período de 5 minutos (Figura 5B), foi observada redução em raio do halo de difusão (Figuras 5D e 5E), que apresentou intensidade de coloração reduzida em imersão por 10 minutos (Figura 5C). A área central manteve-se intensamente corada para todas as condições, não havendo diferenças evidentes de circunferência para os tempos de tratamento alcalino (Figuras 5E e 5F). Após lise celular e imersão em solução alcalina, materiais celulares rompidos difundem-se pelo gel, sendo gradualmente perdidos para a solução. Ao término do período, estaria presente apenas material

genético, composto de moléculas de DNA em variável nível de desenrolamento. Com este experimento, porém, observou-se que por ser a coloração por prata não específica para DNA, devem ser estabelecidas condições de ensaio que previnam interferências para análise dos resultados, com adequado período de lise e desenrolamento. Variações de períodos de desenrolamento descritos em diferentes protocolos relacionam-se à sensibilidade desejada para o ensaio e à extensão de danos, tipo de danos e tipos celulares em investigação (Rojas *et al.*, 1999). Yendle e colaboradores (*op. cit.*), em Ensaio Cometa de queratinócitos, células com DNA densamente compactado, observaram variação de morfologia de cometas de células expostas e controles submetidas a diferentes períodos de imersão em solução alcalina para desenrolamento. Os autores sugeriram que talvez o tempo de desenrolamento deva ser otimizado para cada tipo celular aplicado ao Ensaio Cometa. Como método para testar a adequação do período de imersão em solução alcalina para desenrolamento, recomenda-se comparar a extensão da migração do DNA em células controles e tratadas que tenham passado por diferentes condições de desenrolamento, mantendo as demais etapas idênticas (Tice *et al.*, *op. cit.*).

Efeitos da voltagem de eletroforese sobre a morfologia de cometas podem ser observados na Figura 6. Para este experimento, não foi feita exposição a agente genotóxico. Após desenrolamento por 20 minutos, foi feita eletroforese por 20 minutos em voltagens de 0,4 a 0,8 V/cm. Foi observado gradual aumento da intensidade de migração de DNA de acordo com o aumento da voltagem de eletroforese. Caso as lâminas fossem agrupadas e submetidas a avaliação por classificação em classes de danos, cometas observados em condição 0,4 V/cm poderiam ser considerados como da classe 0, cometas de 0,5 V/cm da classe 1, cometas de 0,6 V/cm da classe 2, cometas de 0,7 V/cm da classe 3, e por fim cometas de 0,8 V/cm da classe 4. Considerando que

todos são de condição controle, destaca-se a importância de adequar a voltagem da eletroforese para a avaliação de danos. Medidas de migração de DNA por quebras de fita simples e dupla podem ser equivocadas se o material for arrastado devido a voltagem muito alta, pois ocorreria aumento da migração do DNA por artefato da técnica e não necessariamente por ocorrência de danos. Em voltagens mais altas, toda uma molécula de DNA, e não apenas o DNA quebrado, migraria para além da área do núcleo (Singh & Stephens, 1997). Quanto à morfologia esperada de uma condição controle ideal, considera-se que os cometas formados após 0,5 V/cm são os mais recomendáveis (Figura 6), por apresentarem núcleo intenso e amplo, mas com formação de cauda mínima. Segundo publicação desenvolvida após Workshop Internacional de Procedimentos para Testes de Genotoxicidade (Tice *et al.*, *op. cit.*), condições ótimas de eletroforese devem ser estabelecidas de tal modo que cometas de controles apresentem mínima migração, facilitando que as informações geradas possibilitem a avaliação de variabilidade entre experimentos de um laboratório.

A avaliação de efeitos de períodos de eletroforese de 10 a 25 minutos sobre a morfologia de cometas dos eritrócitos expostos a H₂O₂ e controles, após 10 minutos de desenrolamento, é ilustrada na Figura 10. Para este experimento, foi aplicada voltagem de 1V/cm, que demonstrou ser muito alta para as condições em teste. Cometas de controle após 10 minutos de eletroforese apresentaram cauda evidente e muito deslocada, fator indesejado mesmo que haja diferença clara quanto a expostos, como ocorreu em relação ao diâmetro da cabeça (Figura 10A). Em períodos de eletroforese mais longos, controles e expostos continuam sendo diferenciáveis morfologicamente quanto ao aspecto de caudas e cabeças; porém, para ambas as condições ocorreu gradual aumento de deslocamento de DNA (Figuras 10B e 10C). Em 25 minutos de eletroforese (Figura 10D), há redução intensa do tamanho das cabeças, caudas muito longas e

difusas, principalmente em expostos. Tais resultados estão de acordo com avaliação de tempos de desenrolamento (5 a 60 minutos) e de eletroforese (5 a 20 minutos) de Ensaio Cometa para eritrócitos de teleósteo. Em materiais submetidos por períodos mais longos a esses procedimentos, ocorreu intenso aumento do comprimento das caudas de controles e de expostos, sendo mais evidente em expostos, podendo ocorrer até mesmo difusão, o que impossibilita a realização de medidas (Nacci *et al.*, *op. cit.*). Condições de eletroforese de voltagem muito alta, assim como períodos mais extensos de corrida, podem comprometer a avaliação de danos, sendo importante pré-estabelecer adequadamente estes parâmetros para determinado tipo celular e desenho experimental.

5.3.3 Efeitos do pH sobre cometas

O experimento de avaliação de morfologia de cometas em pH 12,6, 12,7 e 12,8 fundamentou-se em que quebras de fitas simples originadas do rompimento de pontos álcali-lábeis ocorrem a partir de pH 12,6 (Friedberg, 1984 *apud* Miyamae, *et al.* 1997), condição que pode aumentar a sensibilidade do ensaio. É indicado o uso de solução alcalina fraca para a eletroforese, que possibilita manter a sensibilidade do Ensaio Cometa em pH > 13, e ao mesmo tempo produzir caudas longas e facilmente distinguíveis das cabeças, facilitando a avaliação (Klaude *et al.*, 1996). O Ensaio Cometa foi aplicado aos animais de vida livre para biomonitoramento, sendo em pH 12,8 para aves (Pastor *et al.*, 2004) e em pH 12,6 para roedores (Silva *et al.*, 2000).

Para os experimentos em diferentes pHs, foi feito ajuste do pH da solução alcalina com HCl concentrado. A voltagem foi mantida a 0,8 V/cm, e a amperagem ajustada a 300 mA por volume de solução. Buscou-se manter altura de 10 mm de solução sobre as lâminas, considerando que este fator poderia interferir com a eletroforese, já que Singh e Stephens (1997) recomendam volume de tampão de 6 mm acima de superfície das

lâminas.

Experimentalmente, foi observada clara diferença entre cabeças e caudas de cometas de controles e expostos para cada condição de pH (Figura 7). Porém, observou-se igualmente modificação de morfologia de controles de acordo com o aumento de pH, com aumento da ocorrência de caudas. Em pH 12,6, ocorreram danos mínimos em controles, porém expostos a alta concentração de H₂O₂ (200 µM) apresentaram apenas caudas muito discretas (Figura 7A), o que dificultaria a análise visual. Em pH 12,7 e 12,8, caudas de expostos foram mais evidentes, porém foi observada maior ocorrência de danos em controles. Em avaliação por sistema de análise de imagem *ScionImage*, de um modo geral, ocorreram maiores medidas em expostos do que em controles de um mesmo pH, e medidas crescentes de acordo com a diminuição de pH (Figura 8 e Figura 9). Considerando controles e expostos de um mesmo pH, para parâmetros como intensidade média do cometa, intensidade média da cauda e porcentagem de DNA migrado, esta tendência reflete o observado visualmente. Porém, para intensidade média da cabeça os resultados foram opostos ao da observação visual. Considerando os valores crescentes de acordo com a diminuição de pH, medidas obtidas com o sistema de análise de imagem estão de acordo com observação visual para intensidade média da cabeça e intensidade média do cometa, porém apresentaram resultados opostos para intensidade média da cauda e porcentagem de DNA migrado.

Através deste experimento, foi indicada possibilidade de aplicação de Ensaio Cometa em pH 12,6, 12,7 e 12,8 a eritrócitos de robalo, caso tais condições sejam interessantes para a avaliação de danos específicos. Foi possível realizar avaliação com uso de sistema de análise de imagem *ScionImage*, e mesmo que nem todos os parâmetros possam fornecer informações fidedignas sua utilização pode ser útil para

fins de comparação de dados gerados. Porém, deve haver investigação mais extensa quanto às condições específicas para as diversas etapas do ensaio, através da realização de testes e avaliação criteriosa de resultados.

5.3.4 Aplicabilidade de células sanguínea de robalos a exposição *in vitro*

Para o conjunto experimental apresentado, considerou-se que o tempo de desenrolamento de 20 minutos foi muito longo, produzindo cometas mesmo em baixas condições de voltagem (Figura 6). Ao mesmo tempo, após desenrolamento por apenas 10 minutos, mas eletroforese em voltagem em 1 V/cm, ocorreram cometas de caudas longas mesmo em controles após eletroforese por 20 e 25 minutos (Figura 10). Tendo conhecimento de que a seleção de voltagem e tempo de eletroforese deve buscar relação linear entre dose do agente genotóxico e o parâmetro medido (Olive *et al.*, *op. cit.*), aliado a adequado período de desenrolamento; e com base nos resultados de experimentos apresentados, foram estabelecidas condições para a realização de experimento *in vitro*, para avaliar a padronização de condições do Ensaio Cometa. As condições são: 10 minutos de desenrolamento; 20 minutos de eletroforese em 0,8 V/cm e 300 mA.

O experimento realizado em réplica com exposição *in vitro* de eritrócitos a 10, 25 e 50 μ M H₂O₂ ou PBS, e submissão ao Ensaio Cometa em pH 12,6 e pH > 13, apresentou relação dose-resposta frente a avaliação com uso de sistema de análise de imagem *ScionImage* para diversos parâmetros, como apresentado nas Tabelas 6 e 7 e Figuras 11 e 12. A análise estatística mostrou diferença significativa para a maior parte dos parâmetros. A avaliação da aplicabilidade de eritrócitos de teleósteos já havia sido feita através de série experimental de sistema *in vitro*, pela exposição a agente genotóxico padrão e avaliação de relação dose resposta, visando obter mínimo dano em

controle e máxima sensibilidade em exposição (Andrade *et al.*, *op. cit.*). Através do conjunto experimental, considerou-se viável a aplicação de eritrócitos de *Centropomus parallelus* em estudos de genotoxicidade empregando o Ensaio Cometa. A escolha da aplicação de condições alcalinas em pH 12,6 ou em pH > 13 deve ser considerada frente aos danos em avaliação. Para os experimentos de exposição *in vivo* a β -naftoflavona, foi escolhida a aplicação de Ensaio Cometa em pH>13, que revela diferentes tipos de quebras ao DNA. Esta condição foi aplicada a experimento que encontrou danos ao DNA de enguias expostas a BNF (Nigro *et al.*, *op. cit.*), indicando que danos associados devem ser revelados nesta condição alcalina.

5.3.5 Análise visual e análise por sistema de análise de imagem

Para o uso de sistema de análise de imagem, não foi feita calibração. Assim, as medidas foram fornecidas em unidades arbitrárias (U.A.). O sistema *ScionImage* foi utilizado para a análise de cometas corados por prata por Rucinska e colaboradores (2004). O experimento para adequação do nível de “threshold” indicou que de acordo com o nível estabelecido há modificação da leitura de parâmetros. Dentre os valores testados, o “threshold” de 70 foi o mais adequado para a análise de cometas revelados com as condições experimentais utilizadas neste trabalho. Foi feita adaptação do macro para manter o índice inicial neste valor quando da abertura do programa, sendo porém passível de modificação posterior caso fosse mais adequado a lâminas específicas, devido a qualidade de coloração. De um modo geral, a avaliação de controles e expostos apresentou diferenças mais evidentes em parâmetros diretamente ligados à intensidade de coloração. Tal fator foi surpreendente, pois a coloração de prata não é proporcional com a concentração de DNA (Reinhardt-Poulin *et al.*, *op. cit.*), porém apresentou certa relação quantitativa com a ocorrência de DNA.

Ao mesmo tempo, a análise visual de cometas é método rápido e simples, e há grande grau de concordância com a avaliação por uso de sistema de análise de imagem. A análise visual tem particular interesse para pesquisadores que ainda estão avaliando a aplicabilidade da técnica, não exigindo investimento inicial em equipamentos analíticos de alto custo (Collins, 2004). Os cometas são classificados em diversas categorias, baseadas no comprimento de migração e na proporção relativa de DNA na cauda, atribuindo-se valor numérico a cada classe de migração (Tice *et al.*, *op. cit.*). Foi indicada alta sensibilidade para a análise por classificação visual de cometas corados por prata, com detecção de efeitos a partir de exposição a 10 μM , sendo este um método rápido, simples e que pode ser realizado com uso de microscópio óptico comum (Garcia *et al.*, *op. cit.*). A coloração por prata é permanente, e pode ser aplicada em condições de trabalho de campo, não necessitando de equipamentos para fluorescência.

Para os experimentos posteriores de exposição a β -Naftoflavona, foi escolhido para avaliação o método de análise visual, sendo adequado à coloração por prata, e viabilizando a análise da grande quantidade de lâminas geradas.

5.4 EXPERIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DA BNF

Na Tabela 10 encontram-se dados sobre Porcentagem de Danos de cada Classe de Danos em cada grupo experimental. A tabela mostra também a Frequência de Danos, calculada como a porcentagem de todos os danos encontrados em cometas de cada peixe.

Os dados indicam:

- (i) Alta Frequência de Danos em todos os grupos experimentais, inclusive controles;
- (ii) Grande variação de dados dentro de cada grupo;
- (iii) Não foi constatada ocorrência predominante de qualquer classe de dano em qualquer grupo experimental.

A alta Frequência de Danos em controles é comumente descrita como alto nível de fundo (“background”) em organismos marinhos (Nacci *et al.*, *op. cit.*; Wilson *et al.*, 1998). Em peixes e outros organismos marinhos, o alto nível do fundo é conhecido por muito autores, tendo sido atribuído a várias possíveis causas, tais como temperatura (Buschini *et al.*, 2003); sexo, idade, local e período de coleta (Akcha *et al.*, *op. cit.*); período anterior de coleta e tempo de manutenção em cativeiro (Wilson *et al.*, *op. cit.*).

Tecnicamente, o alto nível de fundo pode ser atribuído a:

- Expressão de pontos álcali-lábeis por exposição a forte solução alcalina, de pH>13, em desenrolamento e eletroforese, indicado por redução de danos (ID e análise de imagem) em controles de pH a 12,6;
- Temperatura em eletroforese (Buschini *et al.*, *op. cit.*; Speit *et al.*, 1999). O processo inteiro foi feito em sala de temperatura controlada, sobre gelo ou a 5° C, sendo este fator, portanto, pouco provável para explicar os resultados;
- Intensa migração em células controles pode refletir danos que são relativamente pouco sensíveis a alcalinidade, mas que rompem-se após exposições longas ao

tratamento alcalino (Yendle *et al.*, *op. cit.*). O protocolo utilizado aplicou desenrolamento de 10 minutos, sendo também este fator pouco provável.

Os dados obtidos, assim, não permitiram a identificação da causa do alto nível de fundo. O alto nível de fundo que ocorreu em controles poderia também ter ocorrido em grupos expostos, independentemente de efeitos da BNF. Nesse caso, os altos níveis de fundo de controles e de expostos poderiam mascarar efeitos da BNF.

Quanto ao período de manutenção em cativeiro, o Ensaio Cometa em células de brânquias do mexilhão *Mytilus edulis* indicou grande variação de danos em controles não tratados mantidos por diferentes períodos (Wilson *et al.*, *op. cit.*): controles avaliados logo após a coleta apresentaram baixos níveis de danos, enquanto controles mantidos por 14 dias apresentaram alto índice de danos. Foi indicada possível interferência de estresse oxidativo, fato apoiado por redução de índice de danos em controles que receberam dieta com vitamina E (anti-oxidante) sem afetar efeitos de agentes genotóxicos, para *in vitro* e *in vivo*. Em indivíduos desta mesma espécie, foi encontrado aumento da intensidade de danos ao DNA com o aumento da idade (Accomando *et al.*, 1999), indicando que o envelhecimento de mexilhões é caracterizado por acúmulo contínuo de danos ao DNA, relacionado a diversas disfunções metabólicas que ocorrem em diferentes estágios de vida dos animais.

Nossos dados podem sugerir a possibilidade de interferência de efeitos de DMSO, utilizado como solvente para a BNF. Porém, diversos estudos de genotoxicidade utilizaram o solvente para dissolver a BNF, na mesma concentração aplicada neste trabalho, e não indicaram interferência com resultados (Nigro *et al.*, *op. cit.*; Pacheco & Santos, 2002; Gravato & Santos, 2002; Teles *et al.*, 2003 e 2004; Ahmad *et al.*, in press; Gravato *et al.*, in press).

Dentre as publicações encontradas referentes a genotoxicidade da BNF em teleósteos, a maior parte encontrou indícios de efeitos através da análise de anormalidades nucleares eritrocitárias (Pacheco & Santos, 2002; Gravato & Santos, *op. cit.*; Teles *et al.*, 2003, 2004; Ahmad *et al.*, *op. cit.*; Gravato *et al.*, *op. cit.*). Apenas a publicação de Nigro e colaboradores (*op. cit.*) apresentou dados de efeitos de exposição à BNF em *Anguilla anguilla* avaliados por ensaio cometa, encontrando indicação de genotoxicidade em concentrações mais altas.

6. CONCLUSÕES

1. Indivíduos da espécie *Centropomus parallelus* podem fornecer sangue para procedimentos experimentais, com acesso através do Ducto de Cuvier, sem comprometimento aparente de sua sanidade, possibilitando a realização de estudos que requeiram repetidas obtenções de amostras de sangue de um mesmo animal.
2. Eritrócitos de teleósteos marinhos submetidos ao Ensaio Cometa em versões alcalinas podem ser corados por prata, permitindo avaliação visual por morfologia de cometas (Índice de Danos) ou por sistema de análise de imagem utilizando unidades arbitrárias.
3. O sistema de análise de imagem *ScionImage*, com pequena adaptação de macro de Helma e Uhl (2000), demonstrou sensibilidade para avaliar cometas corados por prata, principalmente em parâmetros relacionados à intensidade de coloração.
4. Eritrócitos de robalos, expostos *in vitro* a H_2O_2 , apresentaram danos ao DNA com clara relação dose-resposta, quando submetidos ao Ensaio Cometa em pH 12,6 e em pH>13. Foi indicada aplicabilidade de células sanguíneas desta espécie ao Ensaio Cometa em ambas condições de pH alcalino, o que viabiliza estudos de diferentes tipos de danos.
5. Efeitos de exposições *in vitro* a H_2O_2 foram claramente detectáveis através do Ensaio Cometa, mesmo em baixas concentrações do agente genotóxico ($10\mu M H_2O_2$), indicando alta sensibilidade do tipo celular.

6. Resultados do estudo de avaliação do potencial genotóxico da β -naftoflavona em exposição *in vivo* não foram conclusivos. Apesar de ter sido observada tendência a maior Índice de Danos em indivíduos expostos, quando comparados aos controles de mesmo período de exposição, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

7. Há indicações de que peixes de diferentes coletas, com tamanhos e período de manutenção distintos, podem ter respostas diferentes no que se refere ao Índice de Danos de cometas sob mesmas condições de exposição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accomando, R.; A. Viarengo; M. N. Moore & B. Marchi. 1999. Effects of ageing on nuclear DNA integrity and metabolism in mussel cells (*Mytilus edulis* L.). *Inf. J. Biochem. Cell Biol.*, 31: 443-450.

Ahmad, I.; M. Oliveira; M. Pacheco & M. A. Santos. 2005. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without b-naphthoflavone pre-exposure. *Chemosphere*, 61: 267 –275.

Ahmad, I.; V. L. Maria; M. Oliveira; M. Pacheco & M. A. Santos. 2006. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em 19 jun. 2006 . No prelo.

Akcha, F.; G. Leday & A. Pfohl-Leszkowicz. 2004. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.*, 552: 197-207.

Al-Sabti, K. & C. D. Metcalfe. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.*, 343: 121-135.

Aliaume, C.; A. Zerbi & J. M. Miller. 1997. Nursery habitat and diet of juvenile *Centropomus undecimalis* species in Puerto Rico estuaries. *Gulf Mex. Sci.*, 2: 77-87.

Andrade, V. M.; T. R. O. Freitas & J. Silva. 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.)

and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.*, 560: 57-67.

Belpaeme, K.; K. Cooreman & M. Kirsch-Volders. 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.*, 415: 167-184.

Bombail, V.; D. AW; E. Gordon & J. Batty. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, 44: 383-392.

Bórquez, A. & V. R. Cerqueira. 1998. Feeding behavior in juvenile snook, *Centropomus undecimalis*. I. Individual effect of some chemical substances. *Aquaculture*, 169(1/2): 25-35.

Buschini, A.; P. Carboni; A. Martino; P. Poli & C. Rossi. 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.*, 537: 81-92.

Cerda, H.; H. Delincée; H. Haine & H. Rupp. 1997. The DNA 'comet assay' as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.*, 375(2): 167-181.

Ciereszko, A.; T. D. Wolfe & K. Dabrowski. 2005. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquat. Toxicol.*, 73: 128-138.

Collins, A. R. 2004. The Comet Assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 26: 249-261.

Cotelle, S. & F. Férard. 1999. Comet Assay in Ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.*, 34: 246-255.

Devaux, A.; M. Pesonen & G. Monod. 1997. Alkaline Comet Assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. in Vitro*, 11: 71-79.

Dhawan, A.; M. Bajpayee; A. K. Pandey & D. Parmar. 2004. ITRC: The SCGE/Comet Assay Protocol. 1. Protocol for the Single Cell Gel Electrophoresis : Comet Assay for rapid genotoxicity assessment. 10 p. Disponível em: www.comet.itrcindia.org T. Acesso em 01 ago. 2004.

Dusinska, M. 2000. The Comet Assay modified for detection of oxidised bases with the use of bacterial repair endonucleases. Industrial Toxicology Research Centre. 7 p. Disponível em: www.comet.itrcindia.org. Acesso em 01 ago. 2004.

Figueiredo, J. L. & N. A. Menezes. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleostei (2). São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 90 p.

Frenzilli, G.; V. Scarcelli; I. Del Barga; M. Nigro.; L. Förlin; C. Bolognesi & J. Sturve. 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.*, 552: 187-195.

García, O.; T. Mandina; A. I. Lamadrid; A. Diaz; A. Remigio; Y. Gonzalez; J. Piloto; J. E. Gonzalez & A. Alvarez. 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.

Gilmore, R.G.; C. J. Donohoe, & D. W. Cooke. 1983. Observations on the distribution and biology of east-central Florida populations of the common snook *Centropomus*

undecimalis (Bloch). Florida Sci., 46(3-4): 306-313.

Gontijo, A. M. M. C.; R. E. Barreto; G. Speit; V. A. V. Reyes; G. L. Volpato & D. M. F. Salvadori. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag., 534: 165-172.

Gravato, C. & M. A. Santos. 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. Ecotoxicol. Environ. Saf., 51: 115–127.

Gravato, C.; M. Teles; M. Oliveira & M. A. Santos. 2006. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. - the influence of pre-exposure to [beta]-naphthoflavone. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em 2 jun. 2006. No prelo.

Helma, C. & M. Uhl. 2000. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag., 466: 9-15.

Hoffmann, R. & R. Lommel. 1984. Effects of repeated blood sampling on some blood parameters in freshwater fish. J. Fish Biol., 24: 245-251.

Kamer, I. & B. Rinkevich. 2002. In vitro application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. Toxicol. in Vitro, 16: 177-184.

Kammann, U.; J. C. Riggers; N. Theobald & H. Steinhart. 2000. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag., 467: 161-168.

Kizilian, N.; R. C. Wilkins; P. Reinhardt; C. Ferrarotto; J. R. N. McLean & J. P. McNamee. 1999. Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. *Biotechniques*, 27: 926-930.

Klaude, M.; S. Eriksson; J. Nygren & G. Ahnström. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res. DNA Repair*, 363: 89-96.

Lee, R. F. & S. Steinert. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis / comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res. - Rev. Mutat.*, 544: 43-64.

Lemos, N. G.; A. L. Dias; A. T. Silva-Souza & M. S. Mantovani. 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19(2): 197-201.

McGregor, D. 2000. Carcinogenicity and genotoxic carcinogens. In: Ballantyne, B.; T. Mars & T. Syversen, eds. *General and Applied Toxicology*. 2nd edition. London, Macmillan Reference. p. 1099-1117.

McMichael, R. H. & G. Parsons. 1989. Early life history of the snook *Centropomus undecimalis*, in Tampa Bay, Florida. *NE Gulf Sci.*, 10(2): 113-125.

Mitchelmore, C. L. & J. K. Chipman. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.*, 399: 135-147.

Mitchelmore, C. L. & S. Hyatt. 2004. Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Mar. environ. Res.*, 58: 707 -711.

Miyamae, Y.; K. Iwasaki; N. Kinae; S. Tsuda; M. Murakami; M. Tanaka & Y. F.

Sasaki. 1997. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.*, 393: 107-113.

Moller, P. 2006. The Alkaline Comet Assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98: 336-345.

Moyle, P. B. & J. J. Cech. 1988. *Fishes: an introduction to ichthyology*. 2nd. edition. New Jersey, Prentice-Hall. 559 p.

Nacci, D. E.; S. Cayulab & E. Jackim. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.*, 35: 197-210.

Nadin, S. B.; L. M. Vargas-Roig & D. R. Ciocca. 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.*, 49(9): 1183-1186.

Nigro, M.; G. Frenzilli; V. Scarcelli; S. Gorbi & F. Regoli. 2002. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Mar. environ. Res.*, 54(3-5): 517-520.

Olive, P. L.; D. Wlodek; R. E. Durand & J. P. Banáth. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.*, 198: 259-267.

Östling, O. & K. J. Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123(1): 291-298.

Pacheco, M. & M. A. Santos. 1997. Induction of EROD activity and genotoxic effects

by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38: 252-259.

Pacheco, M. & M. A. Santos. 2002. Naphthalene and β -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. *Environ. Int.*, 28: 285-293.

Pastor, N.; R. Baos; M. López-Lázaro; R. Jovani; J. L. Tella; N. Hajji; F. Hiraldo & F. Cortés. 2004. A 4 year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana area (south west Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill. *Mutagenesis*, 19(1): 61-65.

Pedrozo, M. F. M.; E. M. Barbosa; H. X. Corseuil; M. R. Schneider & M. M. Linhares. 2002. *Ecotoxicologia e avaliação do risco do petróleo*. Salvador: Centro de Recursos Ambientais. Cadernos de referência ambiental. Vol. 12. 246 p.

Peters, K. M.; R. E. Matheson Jr. & R. G. Taylor. 1998. Reproduction and early life history of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch) in Florida. *Bull. mar. Sci.*, 62(2): 509-529.

Peterson, M. S. & R. G. Gilmore Jr. 1991. Eco-physiology of juvenile snook *Centropomus undecimalis* (Bloch): life-history implications. *Bull. mar. Sci.*, 48(1): 46-57.

Reinhardt-Poulin, P.; J. R. McLean; Y. Deslauriers; W. Gorman; S. Cabat & M. Rouabhia. 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.

Rivas, L. R. 1986. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*.

Copeia, 3: 579-611.

Rocha; A. J. S.; V. Gomes; V. N. Phan; M. J. A. C. R. Passos & R. R. Furia. 2005. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. J. expl mar. Biol. Ecol., 316(2): 157-165.

Rojas, E.; M. C. Lopez & M. Valverde. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl., 722: 225-254.

Rucinska, R; R. Sobkowiak & E. A. Gwózdź. 2004. Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. Cell. Mol. Biol. Lett., 9: 519-528.

Russo, C.; L. Rocco; M. A. Morescalchi & V. Stingo. 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. Ecotoxicol. Environ. Saf., 57(2): 168-174.

Silva, J.; T. R. O. Freitas; J. R. Marinho; G. Speit & B. Erdtmann. 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. Genet. Mol. Biol., 23(1): 241-245.

Singh, N. P.; M. T. McCoy; R. R. Tice & E. L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res., 175: 184-191.

Singh, N. P. & R. E. Stephens. 1997. Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. Mutat. Res. DNA Repair, 383: 167-175.

Slupphaug, G.; B. Kavli & H. E. Krokan. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag., 531:

231-251.

Speit, G.; K. Trenz; P. Schütz; A. Rothfuß & O. Merk. 1999. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol. Lett.*, 110: 73-78

Taddei, F.; V. Scarcelli; G. Frenzilli & M. Nigro. 2001. Genotoxic hazard of pollutants in Cetaceans: DNA damage and repair evaluated in the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) by the Comet Assay. *Mar. Pollut. Bull.*, 42(4): 324-328.

Taylor, R. G.; J. A. Whittington; H. J. Grier & R. E. Crabtree. 2000. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coast of South Florida. *Mar. Pollut. Bull.*, 98: 612-624.

Teles, M.; M. Pacheco & M. A. Santos. 2003. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β -naphthoflavone. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55: 98-107.

Teles, M.; C. Gravato; M. Pacheco & M. A. Santos. 2004. Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to β -naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 β -estradiol individual and combined exposures. *Chemosphere*, 57: 147-158.

Temple, S.; V. R. Cerqueira & J. A. Brown. 2004. The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval fat snook (*Centropomus parallelus* Poey 1860). *Aquaculture*, 233(1-4): 205-217.

Tice, R. R.; E. Agurell; D. Anderson; B. Burlinson; A. Hartmann; H. Kobayashi; Y. Miyamae; E. Rojas; J. -C. Ryu & Y. F. Sasaki. 2000. Single Cell Gel / Comet Assay:

Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environ. Mol. Mutagen. 35: 206-221.

Walker, C. H.; S. P. Hopkin; R. M. Sibly & D. B. Peakall. 2001. Principles of Ecotoxicology. 2nd. edition. New York, Taylor & Francis. 310 p.

Wilson, J. T.; P. L. Pascoe; J. M. Parry & D. R. Dixon. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag., 399: 87-95.

Winter, M. J.; N. Day; R. A. Hayes; E. W. Taylor; P. J. Butler & K. Chipman. 2004. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag., 552: 163-175.

Yendle, J. E.; H. Tinwell; B. M. Elliott & J. Ashby. 1997. The genetic toxicity of time: Importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag., 375: 125-136.

Zar, J. H. 1996. Biostatistical analysis. Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall. 718 p.

Tabela 1 - Indivíduos de Lote 1 em cada condição experimental

Exposição	Período					
	24 horas		48 horas		72 horas	
	n	Comprimento (mm)	n	Comprimento (mm)	n	Comprimento (mm)
Controle Água	3	204,0 ± 70,9	3	210,3 ± 85,4	3	180,6 ± 82,2
BNF 1 ppm	5	264,6 ± 13,5	4	204,5 ± 62,0	4	201,0 ± 37,79
BNF 5 ppm	5	231,2 ± 66,7	4	202,0 ± 62,5	4	198,0 ± 62,3

n: número de peixes em cada condição
valor médio ± desvio padrão

Tabela 2 – Indivíduos de Lote 2 em cada condição experimental

Exposição	Período					
	24 horas		48 horas		72 horas	
	n	Comprimento (mm)	n	Comprimento (mm)	n	Comprimento (mm)
Controle Água	4	76,2 ± 7,6	4	81,5 ± 8,5	4	76,7 ± 5,6
Controle DMSO	4	77,5 ± 7,9	4	86,7 ± 9,5	4	74,6 ± 2,5

n: número de peixes em cada condição
valor médio ± desvio padrão

Tabela 3 - Revisão de trabalhos que utilizaram exposição *in vitro* de animais aquáticos a H₂O₂

Espécie	Concentração de H ₂ O ₂	t (min) de exposição	T (°C) de exposição	Tipo celular	Meio de cultura	Referência
Anêmona (<i>Anthopleura elegantissima</i>)	0, 50, 100, 200 µM	60 min	15° C	5 tipos celulares	AMA (sem Ca ²⁺ e Mg ²⁺)	Mitchelmore e Hyatt, 2004
Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	1 - 100 µM	5 min	0° C	Eritrócitos	PBS	Gontijo <i>et al.</i> , 2003
Ascidia (<i>Botryllus</i>) e linhagem celular de peixe	53, 130, 2650 µM	120 min	—	Hematócitos e RTH-149	AMA e Meio de cultura	Kamer e Rinkevich, 2002
Butterfish (<i>Pholis gunnellus</i>)	25, 50, 100, 200, 400 µM	30 min	4° C	Eritrócitos	PBS	Bombail <i>et al.</i> , 2001
Golfinho (<i>Tursiops truncatus</i>)	50, 100, 150, 200 µM	60 min	37° C	Leucócitos	PBS	Taddei <i>et al.</i> , 2001
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 e 1 µM	10 min	8° C	Leucócitos	PBS	Kammann <i>et al.</i> , 2000
Truta (<i>Salmo trutta</i>)	0, 20, 50, 100 e 200 µM	60 min	25° C	Eritrócitos e Hepatócitos	HBSS (sem Ca ²⁺ e Mg ²⁺)	Mitchelmore e Chipman, 1998
Truta-arco-íris (<i>Onchorynchus mykiss</i>)	53 - 2650 µM	120 min	4° C	Hepatócitos	Agarose LMP	Devaux <i>et al.</i> , 1997
Linguado (<i>Pleuronectes americanus</i>)	5 – 500 µM	15 min		Eritrócitos		Nacci <i>et al.</i> , 1996

AMA: Água do Mar Artificial

PBS: Tampão Salina Fosfato

HBSS: Solução Salina Tamponada de Hank

Tabela 4 - Porcentagem de células lisadas e não lisadas nas diferentes condições testadas

Volume de agarose (μ l)	Concentração de agarose (%)	Tempo de lise (h)	Lisadas (%)	Não lisadas (%)
100	0,5	1	84	16
		2	93	7
	1	1	61	39
		2	75	25
50	0,5	1	95,5	4,5
		2	97	3
	1	1	93	7
		2	91	9

Tabela 5 - Frequência de Danos em pH 12,6, 12,7 e 12,8

pH	Controles		Expostos	
	Classe 0 (%)	Frequência de danos (%)	Classe 0 (%)	Frequência de danos (%)
12,6	100	0	10	90
12,7	22	78	0	100
12,8	6	94	0	100

Tabela 6 - Valores de parâmetros obtidos com uso de sistema de análise de imagem, de Ensaio Cometa em pH12,6

Exposição	Área do cometa	Intensidade média do cometa	Área da cabeça	Intensidade média da cabeça	Comprimento da cauda	Momento da cauda de Olive	% DNA migrado	Intensidade média da cauda
Controle	358,13	123,23	347,42	118,41	0,53	134,03	7,75	33,66
10 μM H_2O_2	433,36	104,12	279,17	115,61	13,95	525,44	26,16	49,54
25 μM H_2O_2	573,38	96,45	268,90	109,28	23,08	1123,77	43,23	53,28
50 μM H_2O_2	657,98	102,29	268,74	117,39	27,51	1421,88	49,92	58,57

Parâmetros em Unidades Arbitrárias (U.A.)

Tabela 7 - Valores de parâmetros obtidos com uso de sistema de análise de imagem, de Ensaio Cometa em pH>13

Exposição	Área do cometa	Intensidade média do cometa	Área da cabeça	Intensidade média da cabeça	Comprimento da cauda	Momento da cauda de Olive	% DNA migrado	Intensidade média da cauda
Controle	186,46	116,96	162,78	107,60	2,62	233,38	14,87	43,42
10 μM H_2O_2	927,51	117,03	316,37	113,55	25,00	1740,47	66,77	93,24
25 μM H_2O_2	793,82	114,75	207	108,68	25,90	1794,13	75,60	98,48
50 μM H_2O_2	632,71	97,31	196,38	86,17	23,83	1632,24	72,80	92,05

Parâmetros em Unidades Arbitrárias (U.A.)

Tabela 8 – Siglas utilizadas para condições experimentais de peixes do Lote 1

Sigla	Condição de exposição	Período de exposição
CA-24	Controle em água	24 horas
B1-24	BNF 1 ppm	24 horas
B5-24	BNF 5 ppm	24 horas
CA-24	Controle em água	48 horas
B1-24	BNF 1 ppm	48 horas
B5-24	BNF 5 ppm	48 horas
CA-24	Controle em água	72 horas
B1-24	BNF 1 ppm	72 horas
B5-24	BNF 5 ppm	72 horas
Cpos	Controle positivo (100 μ M H ₂ O ₂)	20 minutos

Tabela 9 – Siglas utilizadas para condições experimentais de peixes do Lote 2

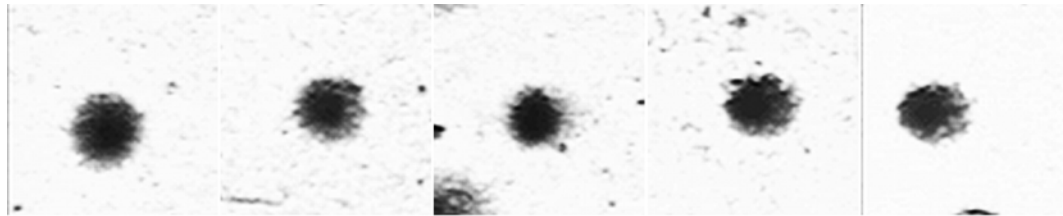
Sigla	Condição de exposição	Período de exposição
C-24	Controle em água	24 horas
D-24	Controle em DMSO	24 horas
C-48	Controle em água	48 horas
D-48	Controle em DMSO	48 horas
C-72	Controle em água	72 horas
D-72	Controle em DMSO	72 horas
Cpos	Controle positivo (100 μ M H ₂ O ₂)	20 minutos

Tabela 10 - Porcentagem de Danos e Frequência de Danos de peixes expostos *in vivo* a diferentes concentrações (0; 1 ppm; 5 ppm BNF) em diferentes tempos (24, 48 e 72) horas

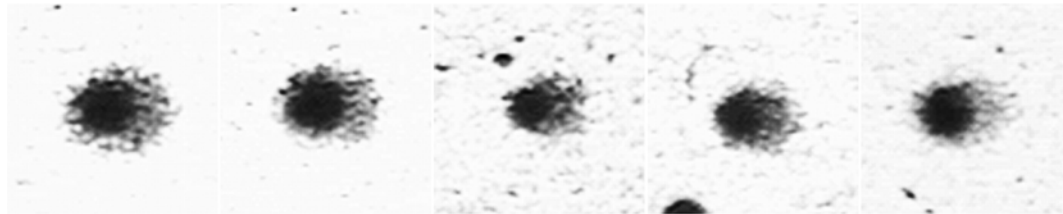
Peixes	Porcentagem de Danos					Frequência de Danos
	classe 0	classe 1	classe 2	classe 3	classe 4	
CA24-1	0	30	52	18	0	100
CA24-2	13	30	25	28	4	87
CA24-3	29	42	17	11	1	71
B124-1	24	24	34	18	0	76
B124-2	5	23	37	35	0	95
B124-3	13	30	26	27	4	87
B124-4	1	15	30	52	2	99
B124-5	27	27	31	12	3	73
B524-1	3	30	48	19	0	97
B524-2	1	36	37	26	0	99
B524-3	6	19	47	28	0	94
B524-4	17	18	41	23	1	83
B524-5	21	30	31	15	3	79
CA48-1	20	16	40	20	4	80
CA48-2	70	27	3	0	0	30
CA48-3	64	24	12	0	0	36
B148-1	8	27	30	29	6	92
B148-2	9	19	27	33	12	91
B148-3	17	35	27	19	2	83
B148-4	25	31	28	13	3	75
B548-1	7	14	30	37	12	93
B548-2	9	13	19	36	23	91
B548-3	37	30	26	7	0	63
B548-4	11	36	30	23	0	89
CA72-1	6	10	22	37	25	94
CA72-2	18	60	19	3	0	82
CA72-3	37	49	12	2	0	63
B172-1	0	0	8	51	41	100
B172-2	35	38	19	7	1	65
B172-3	27	36	26	11	0	73
B172-4	23	51	19	6	1	77
B572-1	3	14	27	44	12	97
B572-2	23	22	26	21	8	77
B572-3	19	24	22	22	13	81
B572-4	12	32	36	18	2	88



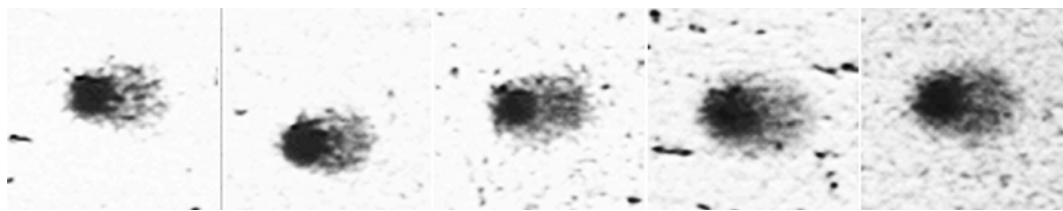
Figura 1: Robalo, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860)



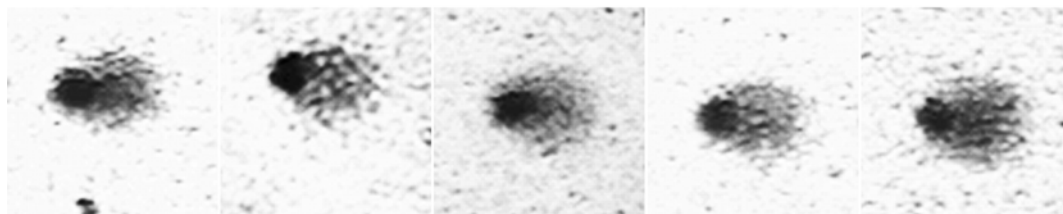
Classe 0



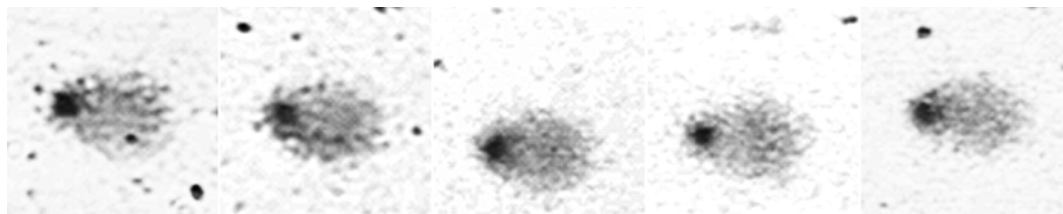
Classe 1



Classe 2

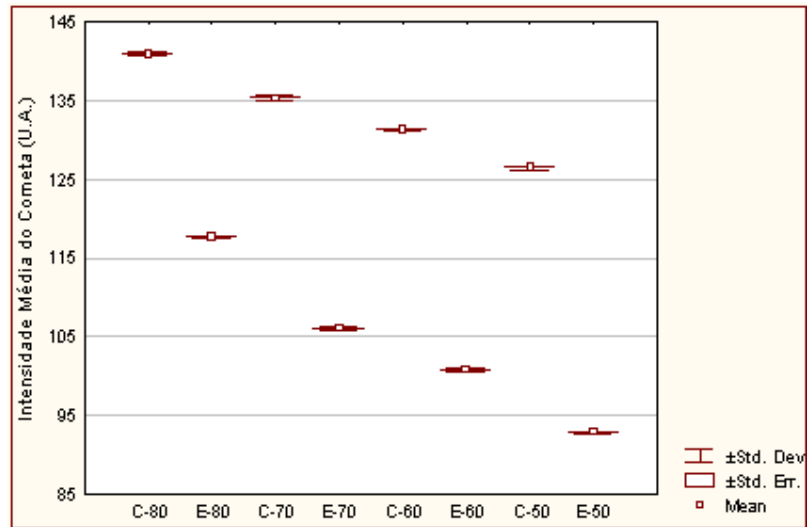


Classe 3

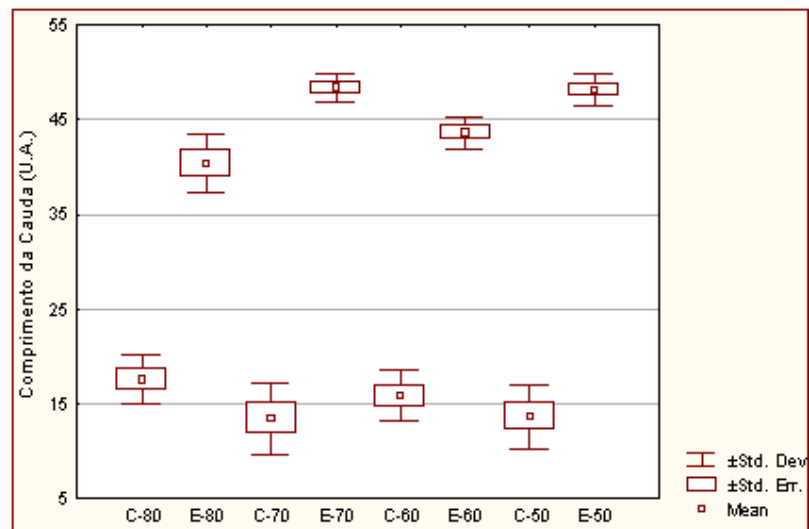


Classe 4

Figura 2: Classificação de cometas em classes de danos.

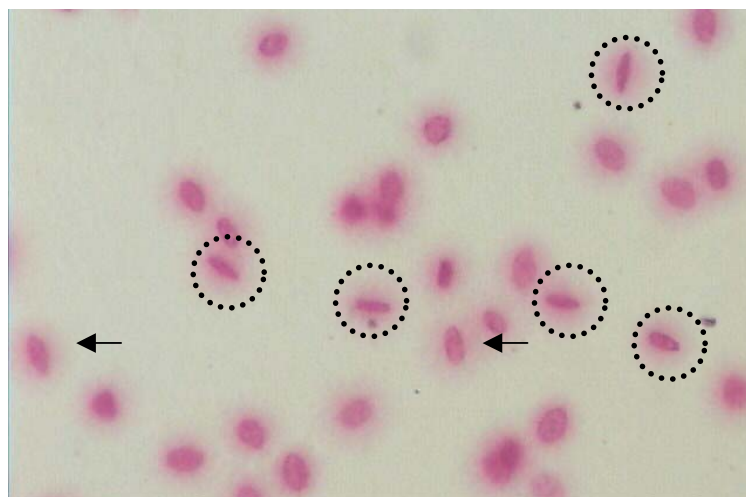


(A)

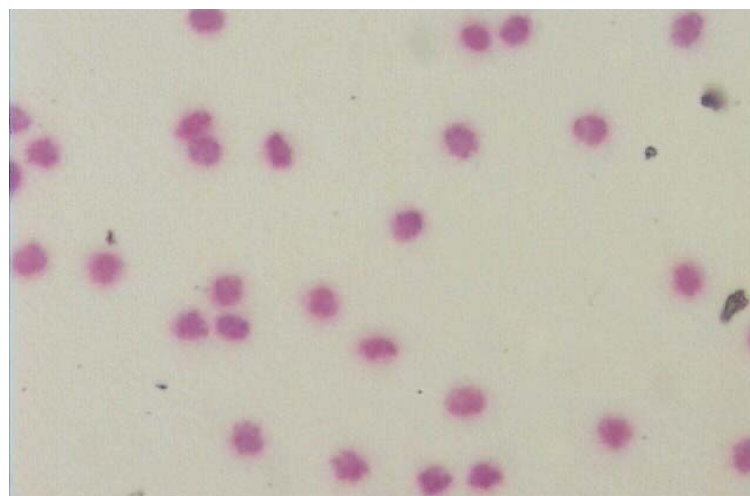


(B)

Figura 3: Experimento para adequação do sistema de análise de imagem. Intensidade Média do Cometa (A) e Comprimento da Cauda (B) no controle “C” e exposto “E”. Dados gerados pelo sistema de análise de imagem, com índice de Threshold ajustado para 80, 70, 60 e 50.



(A)



(B)

Figura 4: Avaliação do período de incubação em solução de lise

(A): Eritrócitos não lisados (circulados) e parcialmente lisados (seta).

(B): Eritrócitos lisados.

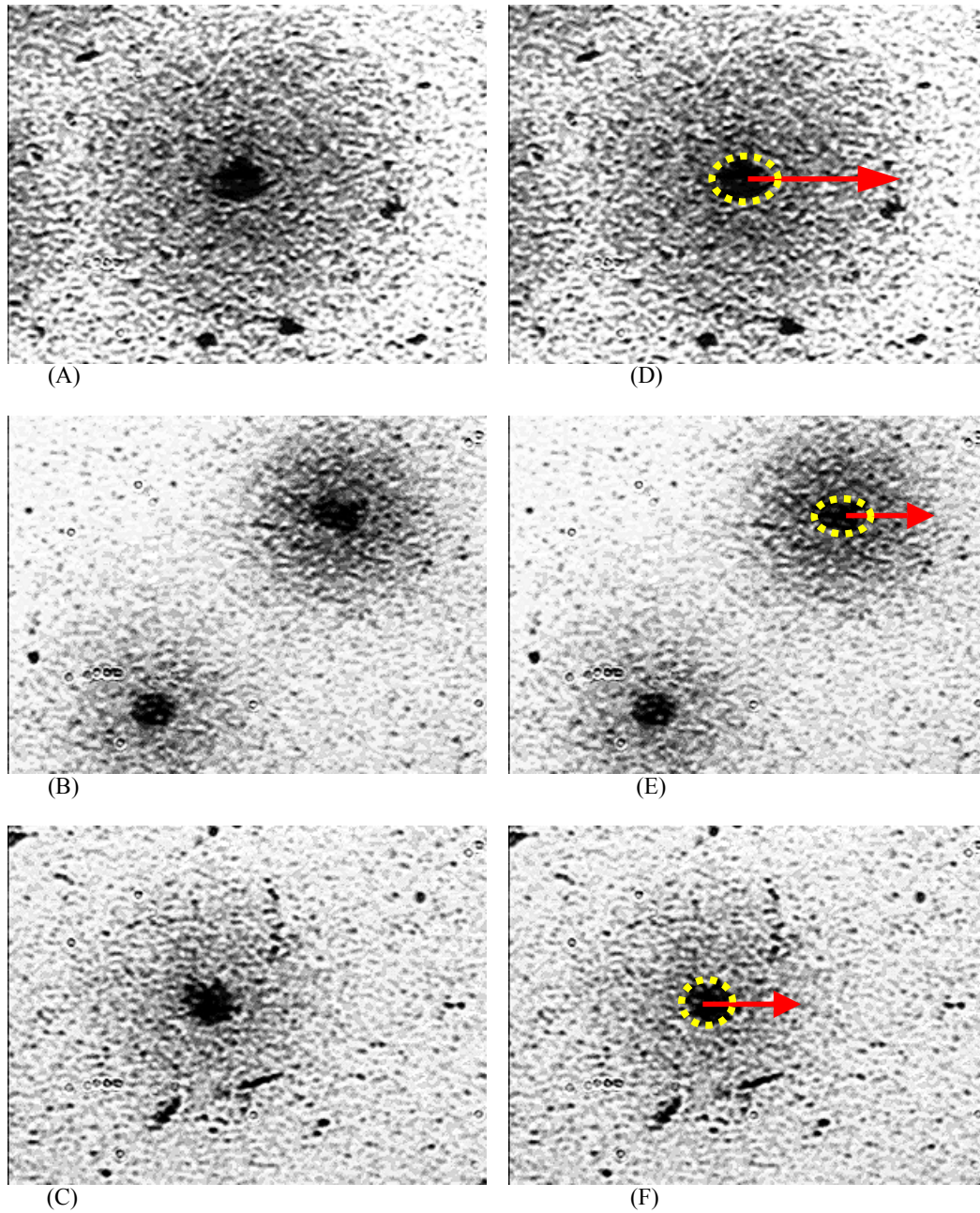


Figura 5: Avaliação de período do tratamento alcalino para desenrolamento do DNA. Difusão de materiais celulares em lâminas submetidas a lise por 2 horas (A), lise e desenrolamento em solução alcalina por 5 minutos (B) ou lise e desenrolamento em solução alcalina por 10 minutos (C), com as respectivas extensões de difusão de materiais - (D), (E) e (F). As setas indicam o raio de difusão, e as circunferências de núcleos foram circuladas. Prata, 400X.

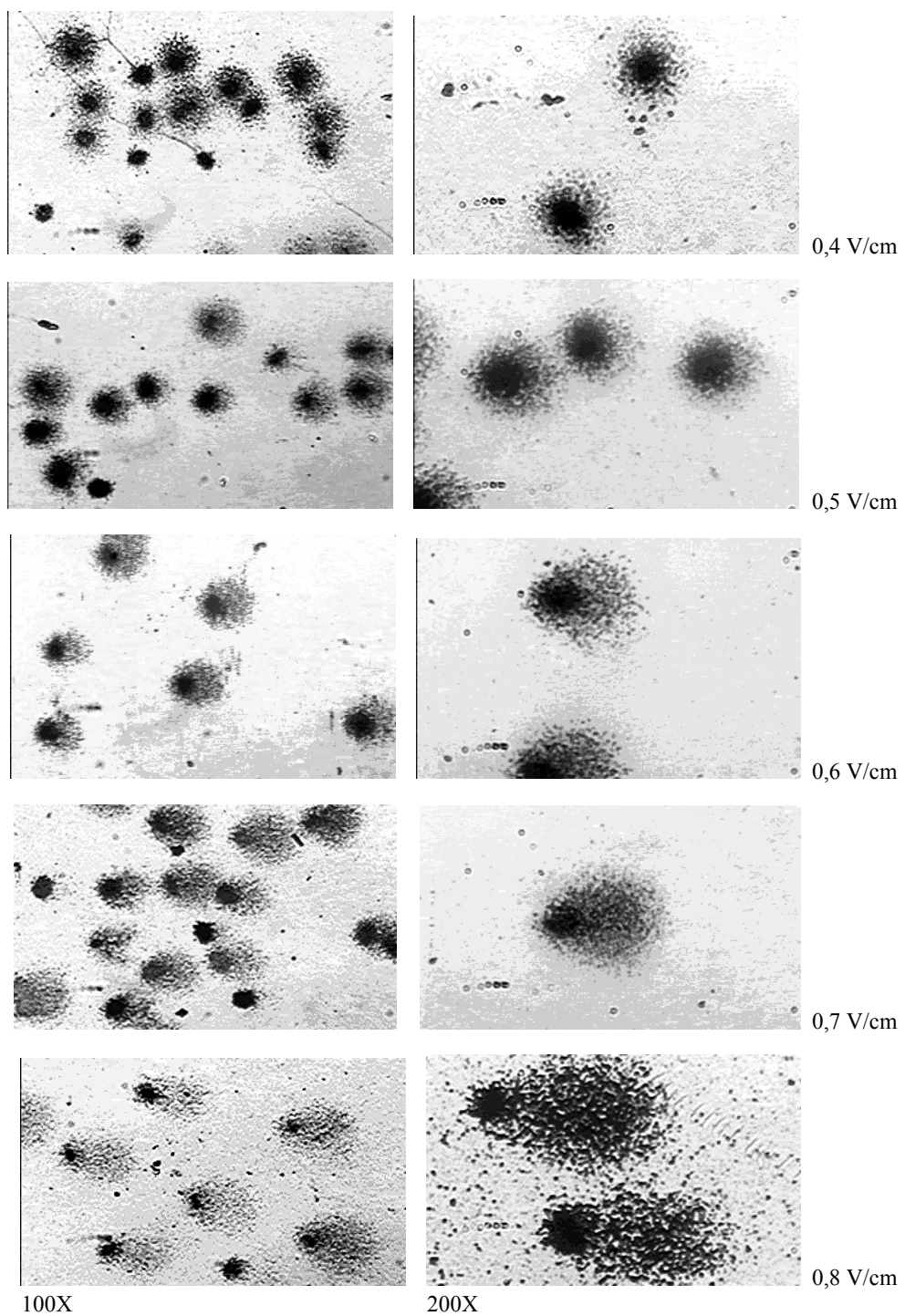
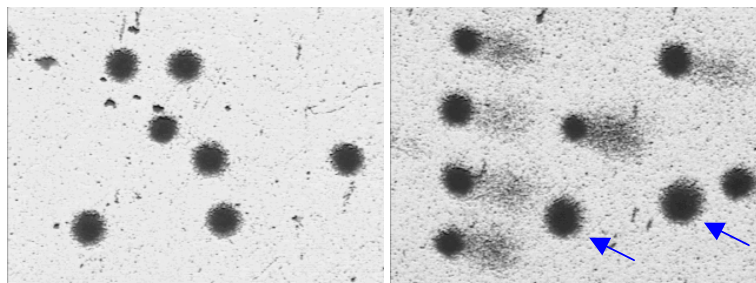


Figura 6: Efeitos da voltagem de eletroforese sobre cometas. Cometas obtidos após 20 minutos de eletroforese, $\text{pH} > 13$, em diferentes voltagens, corados por prata e observados em microscópio óptico comum.

Controle: Cometas de cabeça intacta e tênue halo de difusão periférico

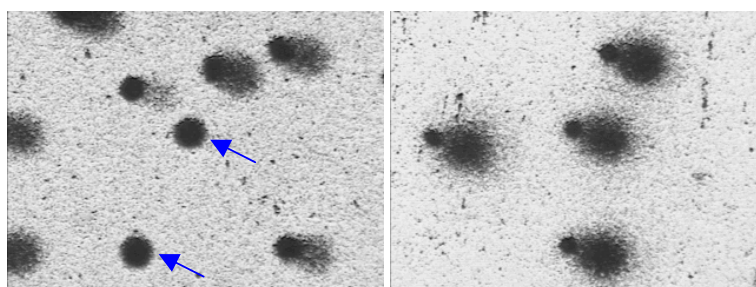
Exposto: Cometas de cabeça intacta e tênue halo de difusão periférico (setas); e cometas de cauda discreta e cabeça definida.



(A)

Controle: Cometas de cabeça intacta e periferia nítida (setas); e cometas de cauda discreta e cabeça definida

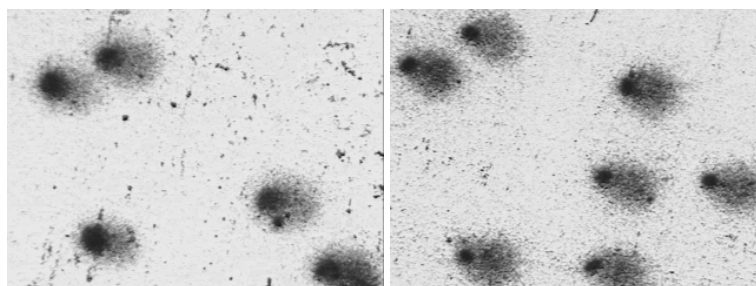
Exposto: Cometas de cauda intensa e cabeça de diâmetro reduzido



(B)

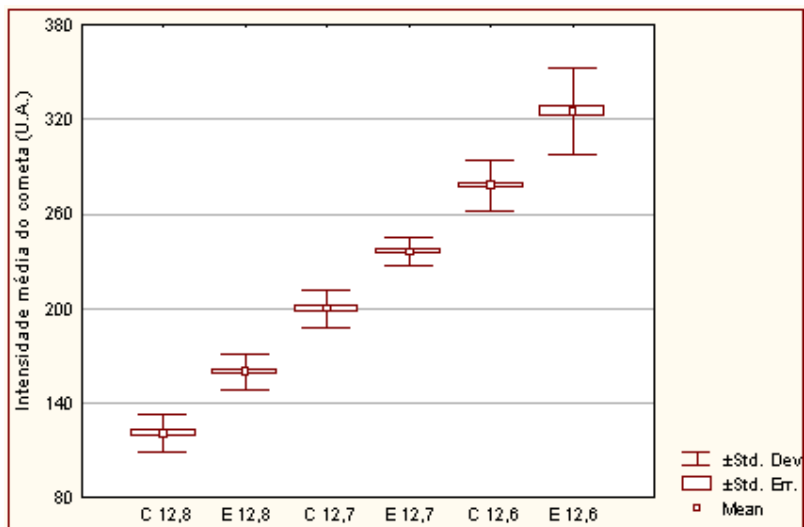
Controle: Cometas de cauda discreta e cabeça definida

Exposto: Cometas de cauda intensa e cabeça com diâmetro reduzido

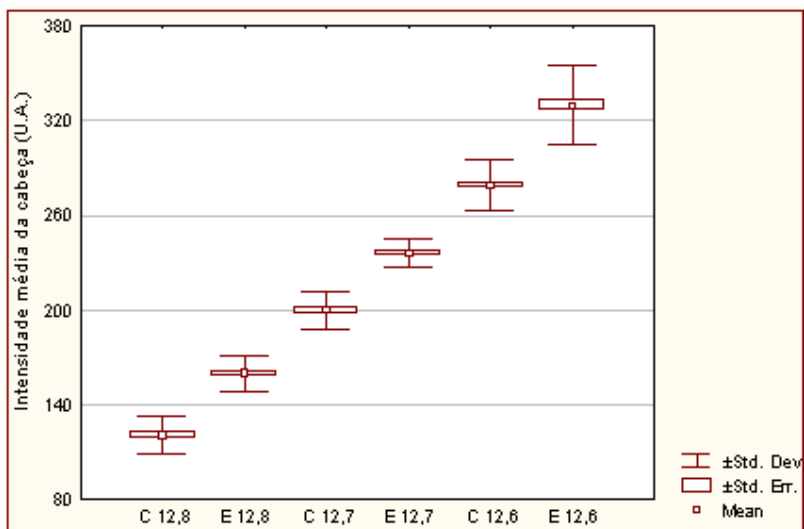


(C)

Figura 7: Efeitos do pH da solução alcalina para desenrolamento e eletroforese. Lâminas de Ensaio Cometa, obtidas de eritrócitos expostos a PBS (controle, lado esquerdo) ou 200 μM H_2O_2 (exposto, lado direito), submetidos a desenrolamento por 10 minutos e eletroforese (0.8 V/cm, 300mA) por 10 minutos, em pH 12,6 (A), 12,7 (B) ou 12,8 (C). Prata, 400X.

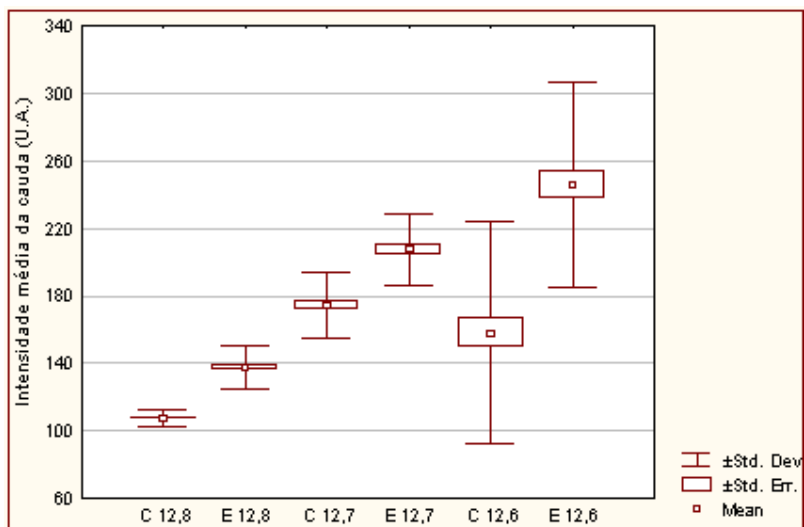


(A)

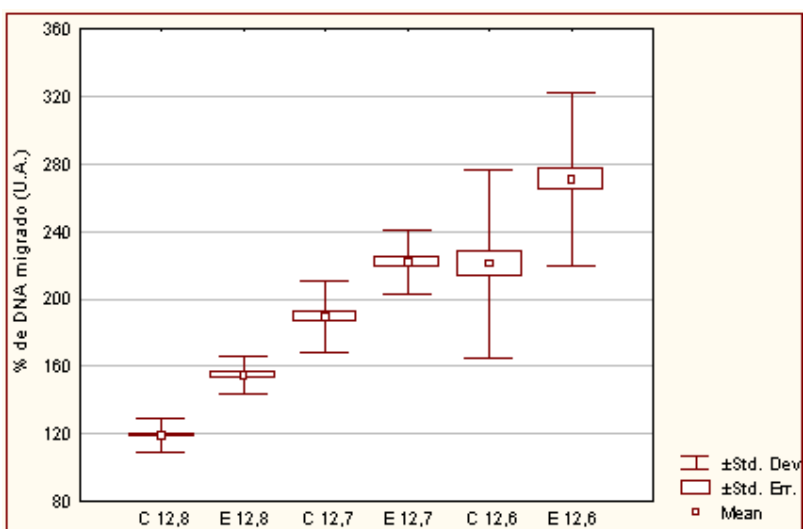


(B)

Figura 8: Efeitos do pH da solução alcalina para desenrolamento e eletroforese. Intensidade média do cometa (A) e intensidade média da cabeça (B). Cometas submetidos a desenrolamento e eletroforese em pH 12,8, 12,7 ou 12,6. Dados obtidos através de sistema de análise de imagem. C: controle; E: exposto.



(A)

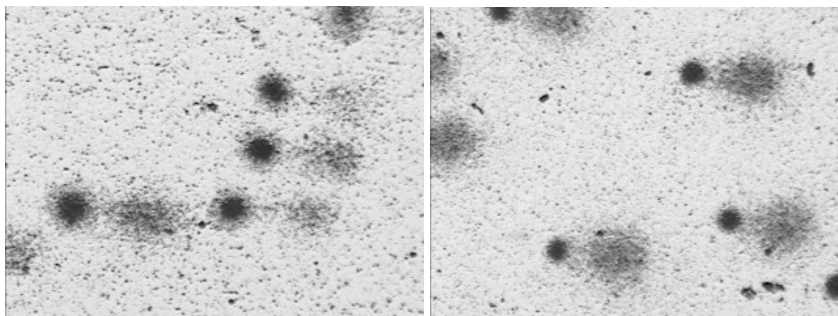


(B)

Figura 9: Efeitos do pH da solução alcalina para desenrolamento e eletroforese. Intensidade média da cauda (A) e porcentagem de DNA migrado (B). Cometas submetidos a desenrolamento e eletroforese em pH 12,8, 12,7 ou 12,6. Dados obtidos através de sistema de análise de imagem. C: controle; E: exposto.

Controle:
Cauda como halo de difusão deslocado

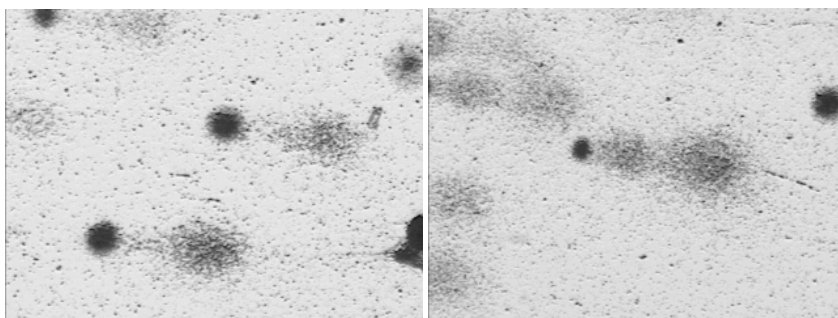
Exposto:
Cauda mais ampla e cabeça de menor diâmetro



(A)

Controle:
Cauda com maior deslocamento

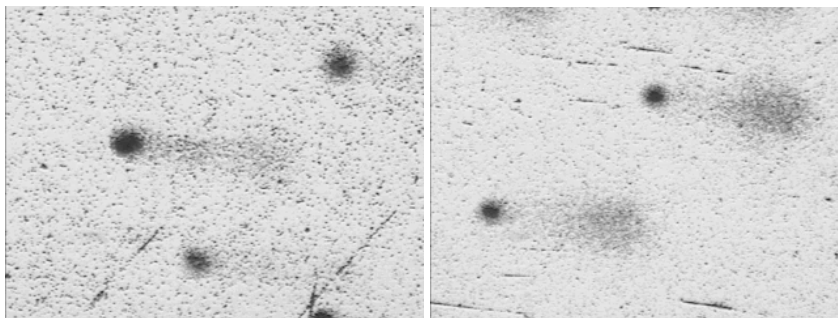
Exposto:
Cauda longa e de coloração intensa



(B)

Controle:
Cauda longa, cabeça reduzida

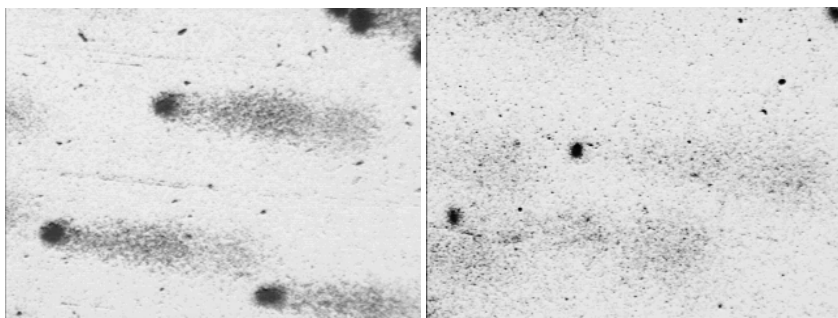
Exposto:
Cauda longa, coloração menos intensa, dispersão de material pelo gel



(C)

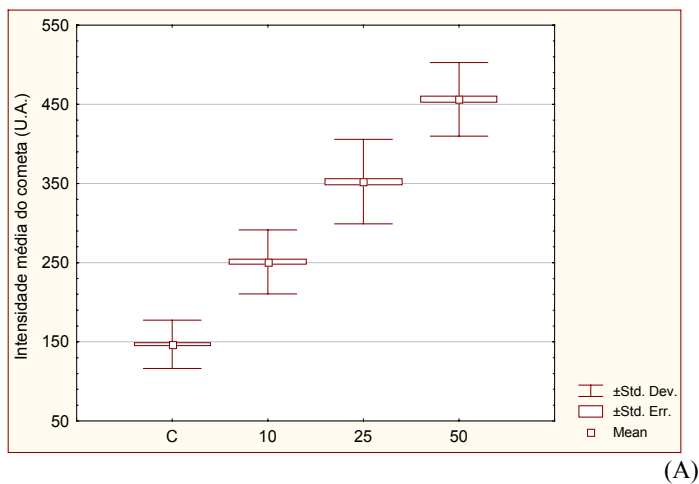
Controle:
Cauda muito longa, cabeça de diâmetro reduzido

Exposto:
Cabeça muito pequena, cauda pouco definida, evidente dispersão de material pelo gel

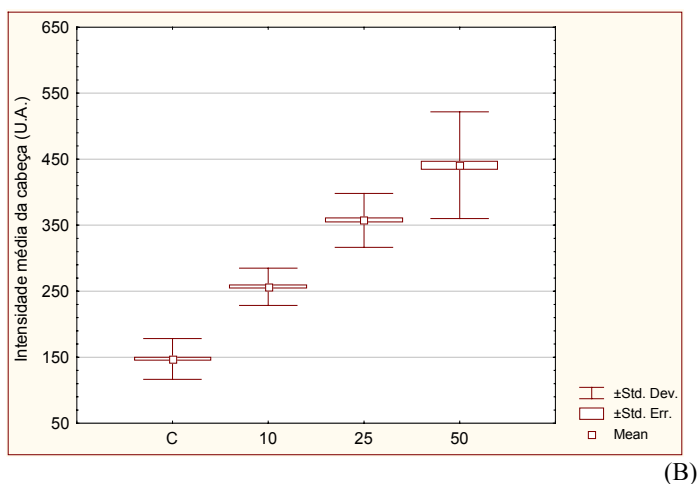


(D)

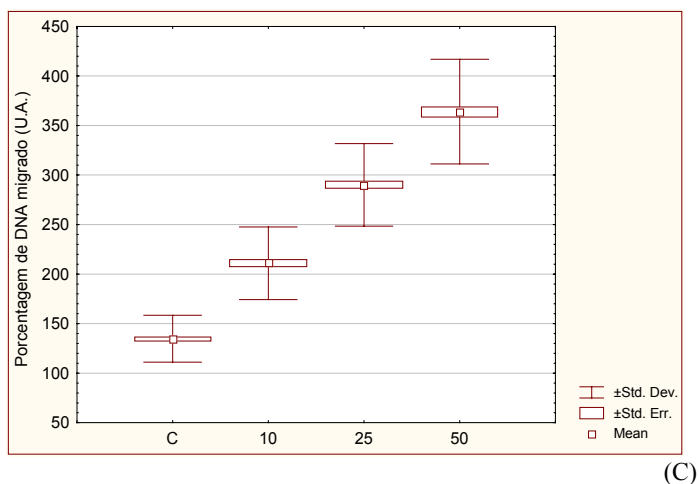
Figura 10: Efeitos do período de eletroforese sobre cometas. Cometas obtidos a partir de eritrócitos controles (imagens em lado esquerdo) ou expostos a $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (imagens em lado direito), submetidos a eletroforese em 1 V/cm e 300mA , $\text{pH } 12,6$, por diferentes tempos de corrida, sendo (A): 10 minutos; (B): 15 minutos; (C): 20 minutos (D): 25 minutos.



(A)

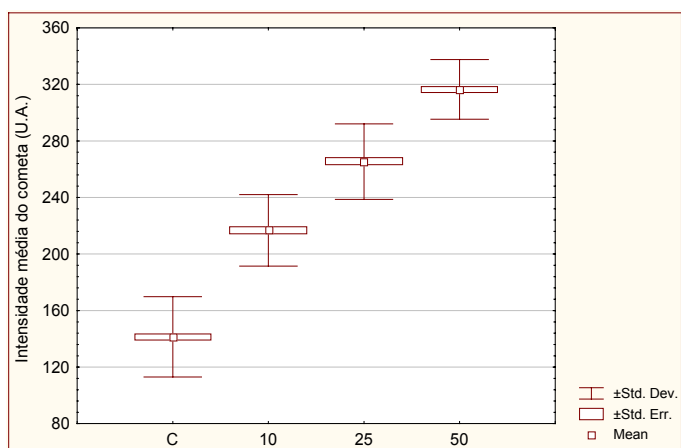


(B)

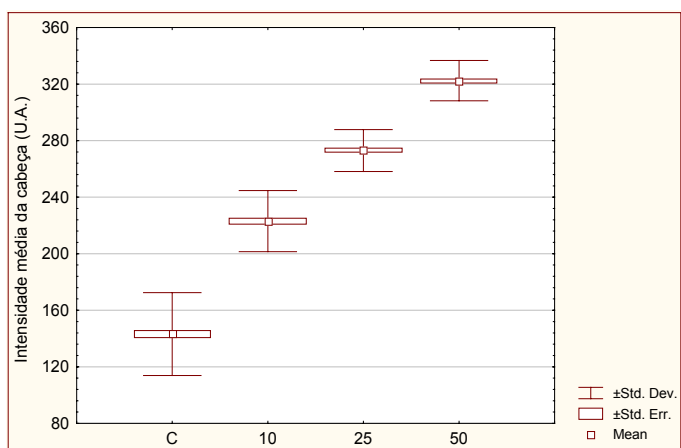


(C)

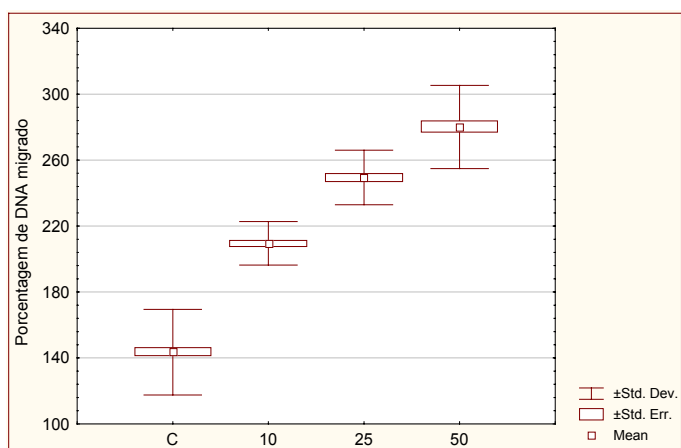
Figura 11: Efeitos do pH 12,6 em desenrolamento e eletroforese. Intensidade média do cometa (A), intensidade média da cabeça (B) e porcentagem de DNA migrado (C). Cometas submetidos a desenrolamento e eletroforese em pH 12,6. Dados gerados pelo sistema de análise de imagem. "C": Controle; 10: 10 $\mu M H_2O_2$; 25: 25 $\mu M H_2O_2$; 50: 50 $\mu M H_2O_2$.



(A)



(B)



(C)

Figura 12: Efeitos do $\text{pH} > 13$ em desenrolamento e eletroforese. Intensidade média do cometa (A), intensidade média da cabeça (B) e porcentagem de DNA migrado (C). Cometas submetidos a desenrolamento e eletroforese em $\text{pH} > 13$. Dados gerados pelo sistema de análise de imagem. “C”: controle; 10: $10\mu\text{M}$ H_2O_2 ; 25: $25\mu\text{M}$ H_2O_2 ; 50: $50\mu\text{M}$ H_2O_2 .

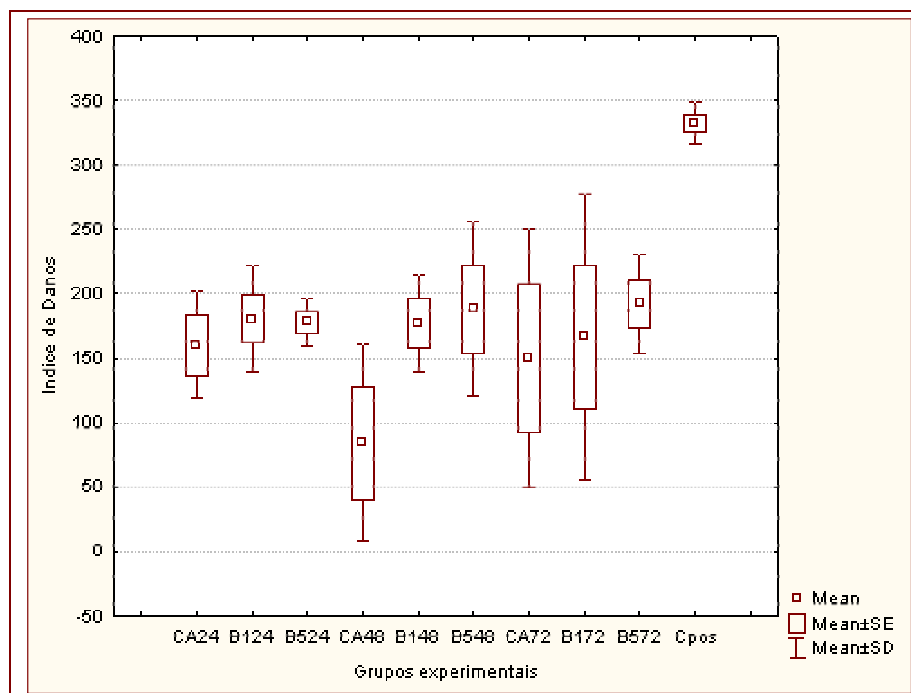
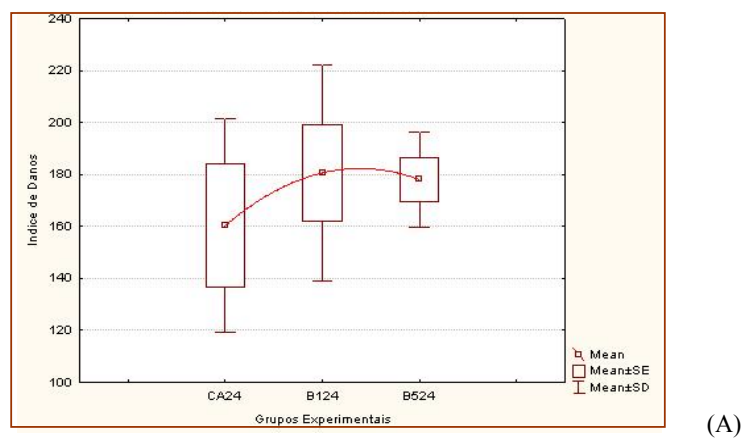
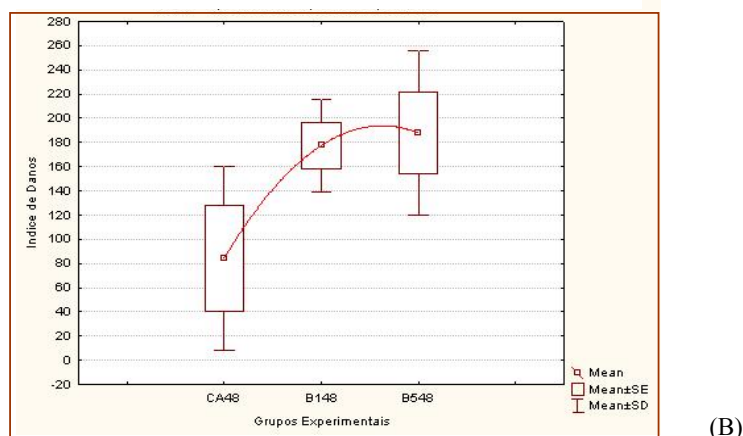


Figura 13: Variação de Índice de Danos de grupos expostos a BNF (0; 1 ppm; 5 ppm) durante diferentes períodos de exposição (24, 48 e 72 horas)

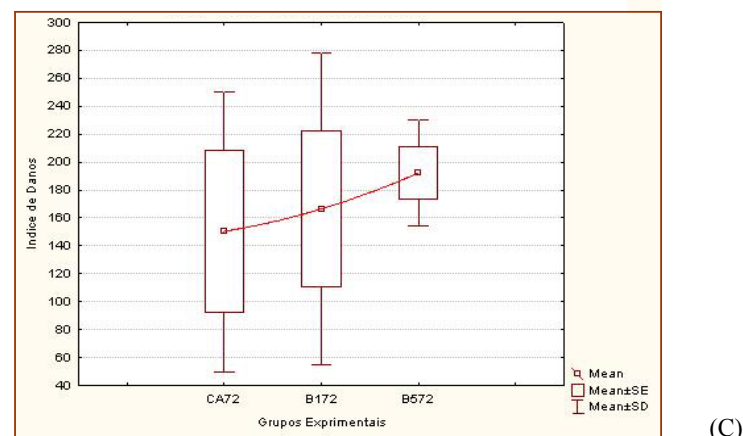
- CA24, B124 e B524: controle em água limpa, expostos a 1 ppm e a 5 ppm de BNF, durante 24 horas
- CA48, B148 e B548: controle em água limpa, expostos a 1 ppm e a 5 ppm de BNF, durante 48 horas
- CA72, B172 e B572: controle em água limpa, expostos a 1 ppm e a 5 ppm de BNF, durante 72 horas
- Cpos: Controle Positivo (100 μM H_2O_2)



(A)



(B)



(C)

Figura 14: Tendência de variação de Índice de Danos em função de concentração de BNF (0, 1 ppm, 5 ppm) e de tempo de exposição. (A): 24 horas, (B): 48 horas e (C): 72 horas.

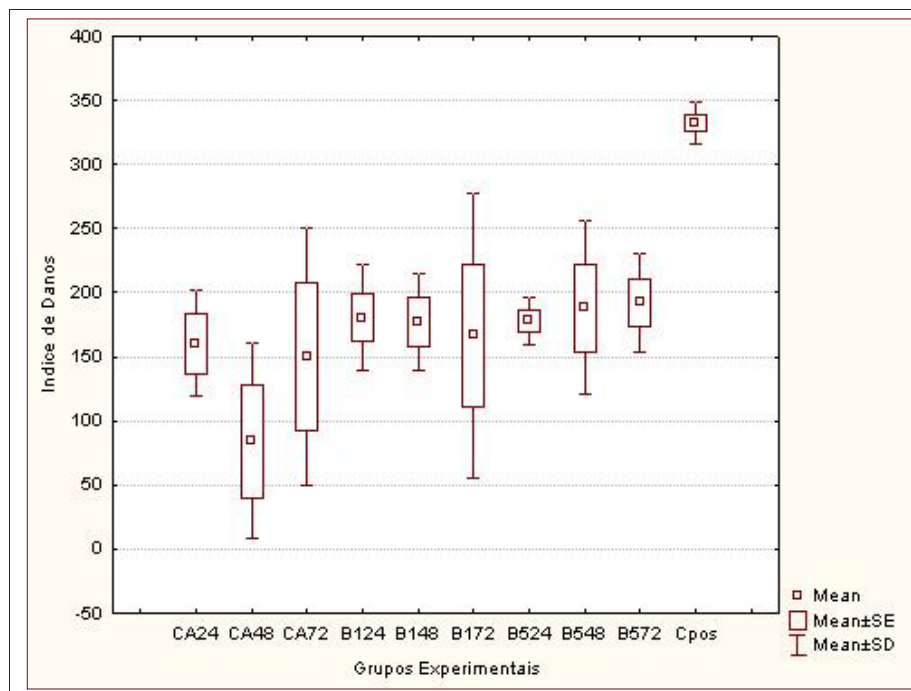


Figura 15: Variação de Índice de Danos de grupos expostos às mesmas concentrações de BNF (0; 1 ppm; 5 ppm) em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas).

CA24, CA48 e CA72: controle em água limpa durante 24, 48 e 72 horas

B124, B148 e B172: expostos a 1 ppm BNF durante 24, 28 e 72 horas

B524, B548 e B572: expostos a 5 ppm BNF durante 24, 28 e 72 horas

Cpos: controle positivo (100 μ M H₂O₂)

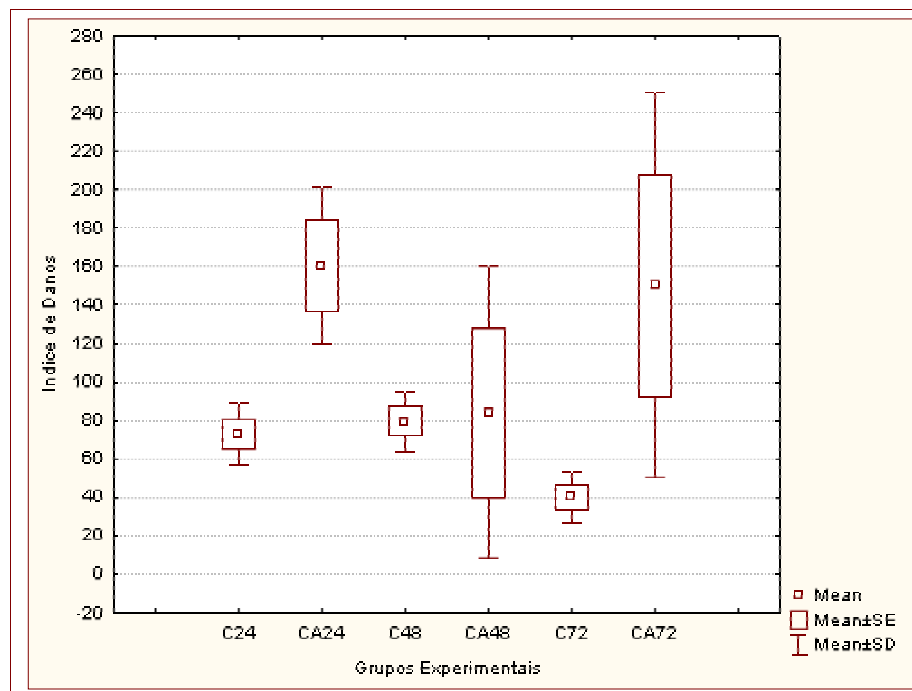


Figura 16: Comparação de Índice de Danos de grupos controles em água, formados por peixes do Lote 1 e peixes do Lote 2.

- CA24, CA48 e CA72: controles em água de 24, 48 e 72 horas de Lote 1
- C24, C48 e C72: controles em água de 24, 48 e 72 horas de Lote 2

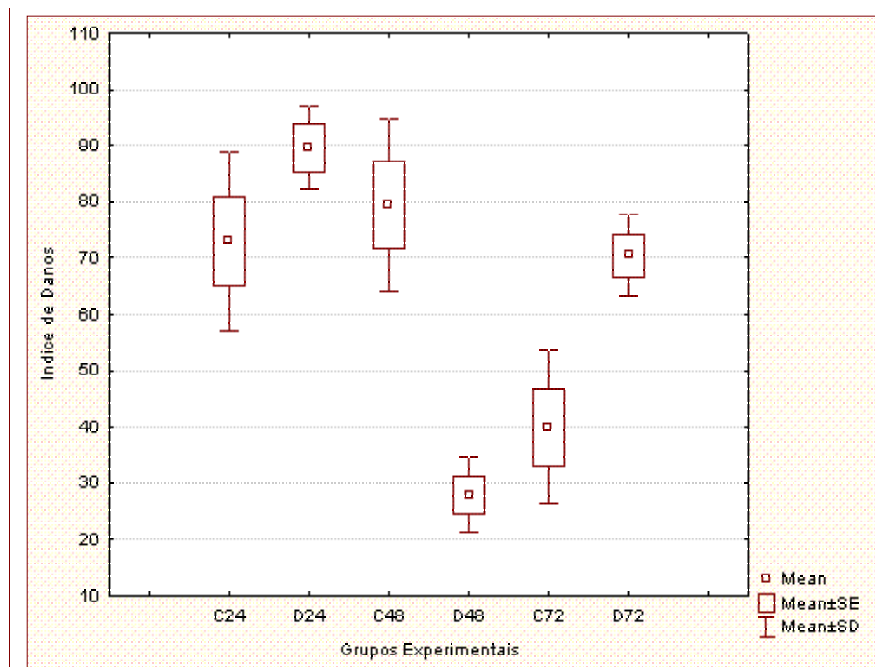


Figura 17: Diferenças de Índices de Danos em peixes de Lote 2, mantidos em água ou em DMSO durante 24, 48 e 72 horas.

- C24, C48 e C72: grupos expostos a água sem DMSO durante 24, 48 e 72 horas
- D24, D48 e D72: grupos expostos a 0,05 ml DMSO / litro durante 24, 48 e 72 horas

Anexo A – Preparo de soluções para o Ensaio Cometa

1. PBS (Phosphate Buffered Saline, Solução Tampão Salina Fosfato)

Dulbecco's PBS, Serva, sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7.6 a 5° C

Composição: NaCl 8 g/l; KCl 0.2 g/l; Na_2HPO_4 1,15 g/l; KH_2PO_4 0.2 g/l; pH 7.6

PBS (Serva)	9,55 g
Volume final (com água destilada)	1000 ml

- Adicionar o PBS em água destilada
- Dissolver com uso de agitador magnético
- Acertar o volume final com água destilada

2. Agarose NPM 1.5% (para 1ª camada de agarose)

Agarose NMP	0.15 g
Volume final (com água destilada)	10 ml

- Para cada 0.15 g de agarose NPM, completar com 10 ml de água destilada
- Aquecer sobre chapa com aquecimento, até a ebulição e total diluição
- Transferir para banho-maria a 60°C

3. Agarose LMP 1% (para 2ª camada de agarose)

Agarose LMP	0.1 g
Volume final (com água destilada)	10 ml

- Para cada 0.1 g de agarose LPM, completar com 10 ml de PBS
- Aquecer sobre chapa com aquecimento, até a ebulição e total diluição
- Transferir para banho-maria a 37°C

4. Solução de lise

Solução de lise estoque (armazenamento em temperatura ambiente)

NaCl	164.16 g
EDTA	41.8 g
Tris	1.35 g
Volume final (com água destilada)	1000 ml

- Adicionar os reagentes a cerca de 800 ml de água destilada
- Fazer mistura com auxílio de agitador magnético
- Adicionar 8 g de NaOH, agitando por cerca de 20 minutos
- Acertar o pH para 10
- Acertar o volume final com água destilada

Solução de lise uso (armazenamento a 5° C)

Solução de lise estoque	89 ml
DMSO	10 ml
Triton X-100	1 ml

- Preparo imediatamente antes do uso
- Refrigerar volume utilizado de solução estoque a cerca de 5° C
- Homogeneizar com uso de agitador magnético
- Para outros volumes, manter a proporção de DMSO 10% e Triton X-100 1%

5. Solução alcalina

Soluções alcalinas estoques (armazenamento em temperatura ambiente)

Solução estoque de NaOH

NaOH	20 g
Volume final (com água destilada)	50 ml

- Adicionar o NaOH a água destilada
- Dissolver com uso de agitador magnético, até total dissolução
- Acertar o volume final com água destilada

Solução estoque de EDTA

EDTA	7.445 g
Volume final (com água destilada)	100 ml

- Adicionar o EDTA a água destilada
- Dissolver com uso de agitador magnético até total dissolução
- Acertar o volume final com água destilada

Solução alcalina uso (300mM NaOH, 1mM EDTA, 5° C)

Solução estoque de NaOH	30 ml
Solução estoque de EDTA	5 ml
Volume final (com água destilada)	1000 ml

1. Preparo imediatamente antes do uso
2. Refrigerar os volumes utilizados de soluções estoques e de água destilada a 5° C
3. O pH final da solução deve ser >13. Para pH mais baixo: adicionar as soluções estoques a volume de água destilada pouco abaixo do final, agitar, ajustar para o pH desejado com HCl concentrado, com uso de agitador magnético, e completar o volume final

4. Para 1 litro de solução pH>13: adicionar as soluções estoques em água destilada, completar o volume final e confirmar o pH
5. Para 1 litro de solução pH 12.6: adicionar as soluções estoques em cerca de 900 ml de água destilada, agitar, adicionar 20 ml de HCl concentrado, com uso de agitador magnético, ajustar de pH até 12.6 com HCl e completar o volume final
6. Para outros volumes, manter a proporção de soluções estoques em relação ao volume final

6. Solução de neutralização (armazenamento em temperatura ambiente)

Tris	48.5g
Volume final (com água destilada)	1000 ml

- Adicionar 48.5g de Tris em cerca de 800ml de água destilada
- Misturar com auxílio de agitador magnético
- Acertar o pH para 7.5 com HCl concentrado (10 M ou mais)
- Completar o volume para 1000 ml com água destilada

Anexo B - Soluções para o método de coloração por prata

1. Solução de Fixação (armazenamento em temperatura ambiente)

Ácido tricloroacético	150 g
Sulfato de zinco heptahidratado	89,1 g
Glicerol	50 ml
Volume final (com água destilada)	1000 ml

- Adicionar os reagentes a água destilada
- Dissolver com uso de agitador magnético
- Completar o volume final com água destilada

2. Soluções de Coloração

Soluções de coloração estoque (armazenamento em temperatura ambiente)

Solução de Carbonato de Sódio 5%

Carbonato de sódio	25 g
Volume final (com água destilada)	500 ml

- Adicionar o Carbonato de Sódio a água destilada
- Dissolver com uso de agitador magnético, até total dissolução
- Acertar o volume final com água destilada

Solução de Nitrato de Prata 0.02% (misturar nesta ordem)

Nitrato de amônio 0,02%	0,1 g
Nitrato de prata 0,02%	0,1 g
Ácido tungstosilícico 0,1%	0,5 g
Formaldeído 0,05%	250 µl
Volume final (com água destilada)	500 ml

- Adicionar os reagentes a água destilada, na ordem indicada
- Dissolver com uso de agitador magnético, até total dissolução
- Acertar o volume final com água destilada

Solução de coloração uso

Solução estoque de Nitrato de Prata 0.02%	68 ml
Solução estoque de Carbonato de Sódio 5% (agitar)	32 ml
Volume final (com água destilada)	100 ml

- Agitar muito bem as soluções estoques
- Separar os volumes a serem utilizados e pré-aquecer por cerca de 20 minutos em estufa a 60°C
- Preparar imediatamente antes de uso
- Para 100 ml de solução final, adicionar 68 ml da solução de nitrato de prata a 32 ml da solução de carbonato de sódio (muito bem agitada) e misturar com uso de agitador
- Para outros volumes, manter a proporção entre as soluções estoques

3. Solução de interrupção (Ácido Acético 1%)

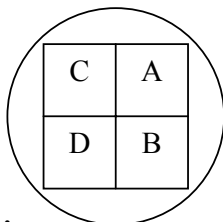
Ácido acético	10 ml
Volume final (com água destilada)	1000 ml

- Adicionar o ácido acético a água destilada
- Dissolver com uso de agitador magnético
- Completar o volume final com água destilada

Anexo C - Protocolo para escolha aleatória de cometas na análise de lâminas

- As lâminas devem ser identificadas por código desconhecido do analisador
- A análise de lâminas de um grupo experimental deve ser feita pela mesma pessoa
- Não devem ser feitas medidas em margens de lâminas e próximo a bolhas de ar
- Utilizar grade em ocular para divisão do campo de visualização
- Padronizar o posicionamento da parte fosca da lâmina no microscópio (para a direita)
- Colocar o aumento em 40 X e verificar o aspecto geral da lâmina (padrão de coloração, distribuição de cometas)
- Colocar o aumento em 200x
- Localizar o campo central (campo 1), de coordenadas 45 X 95 em *Esquema da lâmina*
- Analisar 10 células, no sentido de A para D, conforme em *Esquema do campo*
- Do mesmo modo, analisar os campos 2, 3 4 e 5
- Em cada campo, devem ser analisadas 10 cometas, com 50 cometas por lâmina
- Caso não se alcance este número, continuar a análise nos campos 6 a 9 até completar 50
- Registrar adequadamente os dados obtidos

Esquema do campo:



Esquema da lâmina:

Parte fosca

											85				
			6		4		8				90				
			2		1		3				95				
			9		5		7				100				
											105				
70	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20					

Anexo D - Registro de Escore Visual

Experimento:

Data:

Obs:

Código:

n°	classe	n°	classe
1		26	
2		27	
3		28	
4		29	
5		30	
6		31	
7		32	
8		33	
9		34	
10		35	
11		36	
12		37	
13		38	
14		39	
15		40	
16		41	
17		42	
18		43	
19		44	
20		45	
21		46	
22		47	
23		48	
24		49	
25		50	

Código:

n°	classe	n°	classe
1		26	
2		27	
3		28	
4		29	
5		30	
6		31	
7		32	
8		33	
9		34	
10		35	
11		36	
12		37	
13		38	
14		39	
15		40	
16		41	
17		42	
18		43	
19		44	
20		45	
21		46	
22		47	
23		48	
24		49	
25		50	

Código:

n°	classe	n°	classe
1		26	
2		27	
3		28	
4		29	
5		30	
6		31	
7		32	
8		33	
9		34	
10		35	
11		36	
12		37	
13		38	
14		39	
15		40	
16		41	
17		42	
18		43	
19		44	
20		45	
21		46	
22		47	
23		48	
24		49	
25		50	

Código:

n°	classe	n°	classe
1		26	
2		27	
3		28	
4		29	
5		30	
6		31	
7		32	
8		33	
9		34	
10		35	
11		36	
12		37	
13		38	
14		39	
15		40	
16		41	
17		42	
18		43	
19		44	
20		45	
21		46	
22		47	
23		48	
24		49	
25		50	

Código:

n° X classe =
X 0 =
X 1 =
X 2 =
X 3 =
X 4 =
Soma =

Código:

n° X classe =
X 0 =
X 1 =
X 2 =
X 3 =
X 4 =
Soma =

Código:

n° X classe =
X 0 =
X 1 =
X 2 =
X 3 =
X 4 =
Soma =

Código:

n° X classe =
X 0 =
X 1 =
X 2 =
X 3 =
X 4 =
Soma =

