



Ensaio citogenéticos

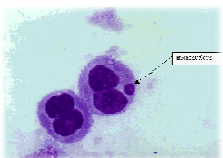
Sibele Borsuk
sibele@ufpa.br

Genômica I

Ensaio citogenéticos

Genética Toxicológica

- Avalia a genotoxicidade de produtos químicos específicos ou agentes físicos quanto ao danos do DNA.



Genômica I

Genética Toxicológica

Aplicações:

Humana

- Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de novas drogas
- Monitoramento humano do risco de mutagênese ocupacional e/ou ambiental.
- Segurança alimentar

Ambiental

- Biomonitoramento
- Poluição hídrica
- Poluição atmosférica
- Controle de efluentes industriais

Genômica I

Ensaio

- Teste de Micronúcleo
- Ensaio Cometa
- Teste de Ames

Fungos (Teste de Levedura), plantas (Teste com *Allium cepa*), insetos (Teste com *Drosophila melanogaster*).

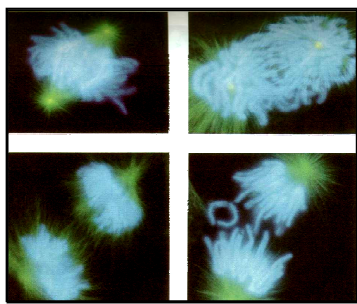
Genômica I

Teste de Micronúcleo

- Consiste na investigação de células previamente expostas a agentes químicos, com a finalidade de detectar possíveis alterações cromossômicas.
- Baseia-se num aumento da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos, utilizando-se para isso, preferencialmente, células de mamíferos (medula óssea ou sangue periférico) de animais devidamente tratados.
- Teste *in vivo*

Genômica I

Teste de Micronúcleo- Metodologia



Anáfase normal Anáfase anormal

Genômica I

Teste de Micronúcleo- Metodologia

Procedimento:

1- Camundongos jovens (4-5 semanas)

Grupos 10

Controle positivo: ciclofosfamida 50 mg/kg

Controle negativo

Teste

2- Administração da droga (12 - 30 h)

3- Sacrifício (medula óssea fêmur, lava, centrifuga)

4- Sedimento (duas lâminas, seca ambiente)

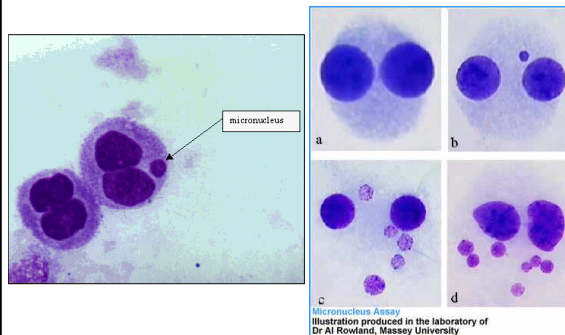
5- Coloração Leishmann (Giemsa ou fluoresceína)

6- Microscopia de fluorescência

7- Contagem dos eritroblastos policromáticos com micronúcleo em relação ao total (mínimo 1000 EP/lâmina).

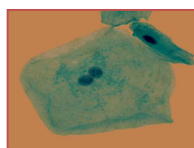
Genômica I

Teste de Micronúcleo- Metodologia

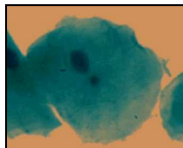


Genômica I

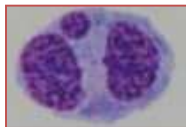
Teste de Micronúcleo- Metodologia



Binucleadas em células da mucosa oral



Micronúcleos em células da mucosa oral

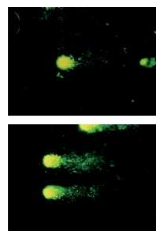


Micronúcleo em células binucleadas do sangue periférico

Genômica I

Ensaio Cometa

Ensaio Cometa (Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE)



- Rydborg & Johanson, 1978
- Rápido e sensível
- Quantificação danos DNA em células em agarose
- não detecta mutações
- detecta lesões genômicas

Genômica I

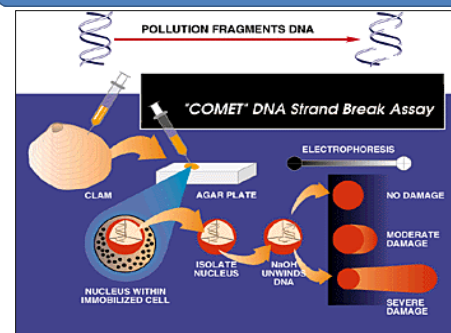
Ensaio Cometa

Procedimento:

- 1- Células embebidas em gel de agarose *low melting* 0,5% (lâminas)
- 2- Lisar sob condições alcalinas (ou neutras)
- 3- Eletroforese
- 4- Segmentos DNA livres migram fora do núcleo
- 5- Observação microscópica
- 6- Classificação das células em classes (0-4)

Genômica I

Ensaio Cometa



Genômica I

Ensaio Cometa

Genômica I

Ensaio Cometa

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

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

Genômica I

Teste de Ames

- Descrito por Bruce Ames e seu grupo da Universidade da Califórnia, Berkeley, na década de 70.
- É um ensaio biológico para avaliar o potencial mutagênico de compostos químicos.
- É utilizado pelo FDA para testes químicos rápidos e baratos.
- Utiliza cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* que carregam mutações em genes envolvidos na síntese de histidina ou seja, são mutantes auxotróficos e sensíveis a agentes mutagênicos.
- Não é um modelo perfeito para os seres humanos por ser procarionto.

Genômica I

Teste de Ames

Strain	Amino acid Mutation	Type of mutation	DNA target
TA1535	His G46	Base-pair substitution	GC
TA100	His G46	Base-pair substitution	GC
TA1537	His C3076	Frame-shift	GC
TA1538	His D3052	Frame-shift	GC
TA98	His D3052	Frame-shift	GC
TA97	His D6610	Frame-shift	GC
TA102	His G428	Base-pair substitution	AT

Genômica I

Teste de Ames

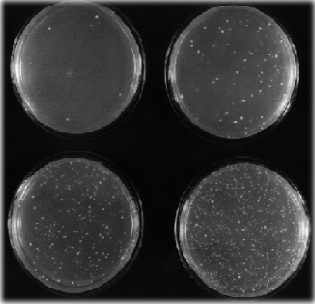
Genômica I

Teste de Ames

Controles positivos e negativos (solvente/veículo).

Genômica I

Teste de Ames



Genômica I

Teste de Ames- Índice de mutagenicidade

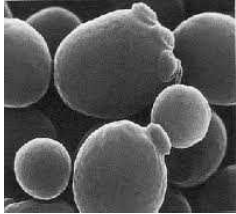
$$IM = \frac{n. \text{ revertentes induzidos}}{n. \text{ revertentes espontâneos}}$$

IM = 1,0 (indica não houve indução de revertentes)
 IM entre <0,6 e 0,7 (pode ser indicativo de toxicidade)
 IM > 1,0 (pode indicar indução de revertentes)
 IM ≥ 2,0 (substância considerada mutagênica)

Genômica I

Teste em Levedura

- Levedura (fungo unicelular) – Eucarioto
- Ferramenta importante em pesquisas
 - mutagenicidade
 - reparo de DNA
 - mecanismos estresse oxidativo



Genômica I

Teste em Levedura

