



MATEUS WILLIAM DE FARIA ELEUTÉRIO

**ENSAIO COMETA NO MODELO VEGETAL *Lactuca sativa*:
UMA ABORDAGEM METODOLÓGICA**

**LAVRAS - MG
2020**

MATEUS WILLIAM DE FARIA ELEUTÉRIO

**ENSAIO COMETA NO MODELO VEGETAL *Lactuca sativa*: UMA ABORDAGEM
METODOLÓGICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Orientadora

Profa. Dra. Silvana Marcussi
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio (a) autor (a).

Eleutério, Mateus William de Faria.

Ensaio cometa no modelo vegetal *Lactuca sativa*: Uma
abordagem metodológica / Mateus William de Faria Eleutério. -
2020.

57 p.

Orientador(a): Larissa Fonseca Andrade-Vieira.

Coorientador(a): Silvana Marcussi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Ensaio cometa. 2. Otimização. 3. *Lactuca sativa*. I.
Andrade-Vieira, Larissa Fonseca. II. Marcussi, Silvana. III. Título.

MATEUS WILLIAM DE FARIA ELEUTÉRIO

**ENSAIO COMETA NO MODELO VEGETAL *Lactuca sativa*: UMA ABORDAGEM
METODOLÓGICA**

**COMET ASSAY IN THE *Lactuca sativa* PLANT MODEL: A METHODOLOGICAL
APPROACH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 06 DE FEVEREIRO DE 2020.

Dra. Silvana Marcussi
Dr. Paulo Sérgio Castilho Preté
Dr. Norival Alves Santos Filho

UFLA
UFLA
UNESP

Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Orientadora

Profa. Dra. Silvana Marcussi
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

RESUMO

O ensaio cometa é o teste mais comum para avaliação de quebras no DNA, com relevante contribuição para diferentes áreas, sobretudo, na toxicologia genética e na toxicologia ambiental. As quebras na molécula de DNA podem ser em suas simples e duplas fitas, por diferentes mecanismos, sendo resultantes da ação de agentes físicos, químicos ou biológicos, produzindo efeitos aneugênicos e clastogênicos. O ensaio cometa é passível de ser aplicado à diversos organismos, tecidos e tipos celulares. Em modelos vegetais é reconhecido como um teste útil que traz informações sobre danos causados por compostos genotóxicos e mutagênicos. Sua adaptação para o modelo vegetal data do ano de 1991. Inicialmente, os modelos vegetais mais comuns empregados na técnica foram *Nicotiana tabacum*, *Vicia fava* e *Allium cepa*. A aplicação do ensaio cometa em novos organismos, tecidos e tipos celulares requer a padronização, otimização e calibração dos resultados a serem observados por meio de indutores de danos conhecidos como, por exemplo, o Metil metanossulfonato (MMS) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Adicionalmente, parâmetros como obtenção e tempo de desnaturação dos nucleóides, eficiência da solução de lise em modelos vegetais e voltagem aplicada durante a etapa de eletroforese são essenciais para uma boa execução do ensaio, proporcionando resultados confiáveis. O modelo vegetal *Lactuca sativa* se mostra um bom modelo para aplicação do ensaio cometa, apresentando características como facilidade no cultivo, alta produção de sementes e rápido desenvolvimento inicial. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi aumentar a reprodutibilidade dos resultados obtidos e portanto a confiabilidade do ensaio cometa no modelo vegetal *Lactuca sativa*, por meio da otimização de parâmetros experimentais que permitam maior contagem de nucleóides amostrados, bem como formação adequada dos cometas durante a migração eletroforética, de modo que estes possam ser avaliados por software em método de score semi automatizado mais confiável, reduzindo o tempo de avaliação e obtenção dos resultados. As informações metodológicas obtidas durante a otimização de parâmetros essenciais para o ensaio cometa aplicado em *Lactuca sativa*, apresentados no presente trabalho, trarão direcionamentos importantes, reduzindo tempos experimentais e números de repetições amostrais e dos custos com a execução da metodologia.

Palavras-chave: Ensaio cometa. *Lactuca sativa*. Fragmentação de DNA. Confiabilidade. Padronização.

ABSTRACT

The comet assay is the most frequently used test for assessing DNA breaks. This assay presents relevant contribution to a number of areas, especially, genetic and environmental toxicology. The DNA breaks can occur in its single and double strands triggered by different mechanisms as an effect of physical, chemical or biological agents, producing aneugenic and clastogenic effects. The comet assay can be applied to various organisms, tissues and cell types. In plant models, this assay is recognized as a useful test which provides information about damage caused by genotoxic and mutagenic compounds. Its adaptation to plant models dates from 1991. At the beginning, plant models such as *Nicotiana tabacum*, *Vicia fava* and *Allium cepa* were commonly employed in the comet assay. Adjusting comet assay to new organisms, tissues and cell types requires standardization, optimization and calibration, which is assessed by means of DNA damage inducers, for example, Methyl methanesulfonate (MMS) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Additionally, some parameters, such as nucleoid obtention, denaturation time, lysis solution efficiency and voltage level during electrophoretic run are relevant in order to achieve an effective performance with reliable results. Among a number of plant models, *Lactuca sativa* stands out for presenting easy cultivation, high seed yield and fast initial growth. Thus, this study aims to increase comet assay reproducibility and reliability in the *Lactuca sativa* plant model, through the optimization of experimental steps allowing a higher count of sampled nucleoids. Moreover, the obtention of comets with adequate shapes during electrophoretic migration was also the aim of the present study. Thus, a more reliable semi-automated scoring method, reduced evaluation time as well as faster assessment of results can be achieved. The methodological information obtained during optimization of essential steps in the comet assay applied to *Lactuca sativa*, presented here, will bring relevant directions that can be used to reduce time overall, number of sample repetitions and costs related to methodological performance.

Key words: Comet assay. *Lactuca sativa*. DNA fragmentation. Reliability. Standardization.

*A minha avó, “madrinha” Maria Vicentina, por ser uma segunda mãe em vida e anjo da guarda em outro plano.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Finalmente, chegada a hora de encerrar mais um ciclo e cabe agradecer a cada um que esteve comigo nesses momentos. Nenhuma estrada é solitária e nenhum indivíduo uma ilha isolada, portanto, seguem os agradecimentos.

Ao programa de Pós-graduação em Botânica Aplicada e aos seus professores e discentes pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica, pela contribuição neste trabalho.

Aos amigos em cada um dos momentos juntos nas disciplinas, nos cafés e nos laboratórios. Em especial aos amigos da turma de mestrado em Botânica Aplicada 2018/1, Ana Luísa, Lucas Muñoz e Jéfyne Carréra.

Aos companheiros e aos professores do laboratório na citogenética, em especial minha orientadora Profa. Larissa.

Aos membros do grupo de estudos Environmental Risk Assesment – ERA pela oportunidade do compartilhamento de ideias e contribuições na minha dissertação.

Ao técnico Felipe por toda ajuda durante a realização do mestrado.

Aos Departamentos de Biologia e de Química, bem como à UFLA, pela disponibilização da estrutura essencial para realização dos experimentos da dissertação e obtenção dos créditos para conclusão do mestrado.

A minha família pelo apoio, em especial meus pais Antônio e Marisa, aos meus irmãos Hugo e Rogério, a minha cunhada Karina e os meus sobrinhos Gustavo e Guilherme.

Aos amigos de casa, compartilhando os dias e as “humilhações”. Bruno, Dayane, Luis e ao Buri por alegrar nossos dias.

Aos meus amigos e irmãos nessa vida: Camila, Willian, Jonata e Gabriel.

Ao Fernando, por estar sempre presente e ser uma das pessoas especiais que cruzaram meu caminho.

Aos amigos que fiz e tenho feito em Lavras, que certamente são para vida toda: Rafaela, Ana Luísa, Larissa, Diogo, Isaac, Lucas e Valkíria.

Aos amigos da CafESAL, pela simpatia e amizade de sempre.

Aos amigos da confraria, Pedro, Marcus, Mariana, Tati, Dani, Gustavo e em especial a Profa. Silvana Marcussi pelas contribuições e atenção de sempre.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

MUITO OBRIGADO!

“Não somos mais que uma casca de noz, quando somos a casca de nós mesmos.”
Autor desconhecido

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 O ensaio cometa em plantas superiores na avaliação de efeitos genotóxicos e mutagênicos	13
3.2 Quebras na molécula de DNA, alterações cromossômicas e mutagenicidade	15
3.3 Agentes citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos	18
3.4 Detecção de danos no DNA pelo ensaio cometa	20
3.5 O ensaio cometa: Padronizações, adaptações e otimizações	22
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	25
SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1	32
O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DE <i>Lactuca sativa</i>: AUMENTANDO A REPRODUTIBILIDADE E CONFIABILIDADE	32

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A versatilidade do ensaio cometa é demonstrada pelas suas mais diferentes aplicações. Desde de suas origens em 1978 (RYDBERG; JOHANSON, 1978) até os relatos de sua adaptação ao modelo vegetal *Vicia faba* (CERDA; HOFSTEN; JOHANSON, 1993; LANIER et al., 2015). Diversas adaptações e otimizações da técnica foram feitas para finalidades específicas (SINGH et al., 1988; GICHNER, 2003; RAPP; HAUSMANN; GREULICH, 2005; GLEI; HOVHANNISYAN; POOL-ZOBEL, 2009; BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2011; POURRUT et al., 2015). Em diversos campos de pesquisa, notadamente na toxicologia genética e na toxicologia ambiental, o ensaio cometa é a principal ferramenta para detecção de efeitos genotóxicos dos mais diferentes compostos e poluentes presentes no ambiente (PIPERAKIS, 2009). A sua aplicação é possível para os mais diferentes organismos, tecidos e tipos vegetais, eucariotos e procariotos (DHAWAN; ANDERSON, 2016). Ainda, o ensaio cometa é passível de ser aplicado em diferentes condições de pH, havendo duas versões da técnica: a neutra e a alcalina. A primeira avalia predominantemente danos associados a dupla fita na molécula de DNA, enquanto que a segunda avalia diferentes danos em sítios álcali lábeis. Os cometos originados pelas duas técnicas, diferem, portanto, quanto aos mecanismos que induzem sua formação. Havendo, assim, uma variação quanto a natureza dos danos causados por agentes genotóxicos (SHAPOSHNIKOV et al., 2008). Nesse contexto, é importante que uma padronização seja feita quando a técnica é aplicada em novas condições, sejam essas as descritas nos mais diferentes protocolos existentes ou a novos organismos e/ou modelos (AZQUETA et al., 2011a). Etapas como a obtenção da suspensão de núcleos, que inclui o tempo de picotagem das raízes (POURRUT et al., 2015) e qual o número de nucleóides obtidos e contados (KOPPEN et al., 2017), concentração de agarose (AZQUETA et al., 2011a), eficiência do uso da solução de lise (POURRUT et al., 2015; ENCISO et al., 2018), tempo de imersão para desnaturação dos nucleóides e voltagem aplicada na etapa de eletroforese (AZQUETA et al., 2011a) bem como a calibração do protocolo usando indutores de danos conhecidos como o metil metanossulfonato (MMS) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (KOPPEN et al., 2017) e mesmo quanto ao método de avaliação empregado (seja esse por escore visual, semi automatizado e automatizado) (AZQUETA et al., 2011b), são passos procedimentais no ensaio cometa, tidos como cruciais para uma execução efetiva e com resultados confiáveis. Dada as diferentes metodologias aplicadas por diversos grupos de pesquisa, a variação entre laboratórios é um problema, inclusive com estudos publicados concernentes a essa discussão (GARCIA et

al., 2004; AZQUETA et al., 2011a; COLLINS et al., 2014). A variabilidade existente entre experimentos executados no mesmo laboratório ou entre laboratórios (laboratórios diferentes avaliando as mesmas amostras) é, portanto, uma questão importante que deve ser avaliada a fim de reduzir as incongruências entre os dados publicados (COLLINS et al., 2014)

O modelo vegetal *Lactuca sativa* é aplicado em muitos estudos e se mostra um bom modelo para análises de ciclo celular, alterações cromossômicas e nucleares, genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade (REIS et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017; ALVES et al., 2018; CARVALHO et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2019; ALVARENGA et al., 2020), e possui características comuns as encontradas em bons modelos experimentais: condições fáceis de cultivo, fácil obtenção das sementes, rápido desenvolvimento inicial (CHANG; BOWMAN; MEYEROWITZ, 2016). Portanto, a adaptação desse modelo vegetal ao ensaio cometa tem se mostrado bem aceita e amplamente aplicada, obtendo-se resultados confiáveis (REIS et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017; DE ASSIS ALVES et al., 2018). Sua aplicação, foi recentemente descrita em estudos de índice mitótico, crescimento a partir de dados morfométricos (como comprimento de raízes) e mesmo avaliação da organização da cromatina através de estudos citogenéticos (fosforilação da histona H3) em resposta ao poluente ambiental SPL (FREITAS et al., 2016).

Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi a otimização do ensaio cometa no modelo vegetal *Lactuca sativa*, visando o aumento da quantidade de nucleóides contados, melhorias na morfologia dos cometas para avaliação semi automatizada e redução do tempo de avaliação dos resultados, mantendo a reprodutibilidade das repetições amostrais e ampliando a confiabilidade dos dados obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Otimização do ensaio cometa para o modelo vegetal *Lactuca sativa*, reduzindo tempo de avaliação das lâminas, aumentando a contagem de nucleóides, melhorando a morfologia dos cometas para avaliação semi automatizada em software sem perda de confiabilidade.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a quantidade de material vegetal, raízes de *Lactuca sativa*, necessária para que pelo menos 100 nucleóides sejam contados por lâmina/triplicata obtendo 300 nucleóides/tratamento.

- Determinar o melhor tempo de maceração do material vegetal, raízes de *Lactuca sativa*, objetivando a contagem de 100 nucleóides por lâmina/replicata obtendo 300 nucleóides/tratamento. Em menor tempo e com menor dano ao DNA causado pela maceração das raízes.
- Verificar a etapa de lise celular para o modelo vegetal *Lactuca sativa* quanto a sua eficiência na obtenção dos nucleóides e com menores danos no DNA.
- Verificar a influência do tempo de desnaturação dos nucleóides na forma dos cometas obtidos.
- Verificar a influência da voltagem aplicada durante a etapa de eletroforese na formação dos cometas obtidos.
- Utilizar os indutores de danos metil metanossulfonato (MMS), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e formaldeído (CH₂O) na calibração e validação do ensaio cometa com as condições encontradas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O ensaio cometa em plantas superiores na avaliação de efeitos genotóxicos e mutagênicos

As plantas superiores se mostram excelentes modelos para avaliar efeitos genotóxicos e mutagênicos, com relatos de sua aplicação desde os anos 1913 (LANIER et al., 2015). Dentre os modelos vegetais empregados em estudos citogenéticos, podem ser citadas as espécies *Allium cepa*, *Nicotiana tabacum*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba*, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*. Diversos estudos empregaram a alface (*Lactuca sativa*) como modelo experimental, sendo obtidos resultados confiáveis e com processos metodológicos reprodutíveis (FREITAS et al., 2016; ANDRADE-VIEIRA; BERNARDES; FERREIRA, 2018; ARAGÃO et al., 2019; PALMIERI et al., 2019). Diferentes podem ser as abordagens e empregos de modelos vegetais para avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Como exemplos, podemos citar os resultados reportados empregando uma abordagem molecular nos modelos vegetais *Lactuca sativa* e *Allium cepa*, em que foram avaliados o padrão de bandas de sequências simples repetidas (SSR ou microssatélites) e de sequências simples repetidas entre dois microssatélites (ISSR) em gel de agarose. Os autores descrevem que a exposição ao SPL e aos seus principais componentes induziu efeitos de ganho, perda e na intensidade com que as bandas eram vistas no gel (ANDRADE-VIEIRA; BERNARDES; FERREIRA, 2018).

Estudos recentes têm demonstrado os efeitos de poluentes em diferentes níveis tróficos e o ensaio cometa é uma das principais ferramentas utilizadas nesses estudos. A exemplo, Aragão e colaboradores relatam os efeitos genotóxicos e aneugênicos observados em função da atividade de fungicidas comerciais, no modelo experimental *Lactuca sativa* (ARAGÃO et al., 2019).

A versatilidade do ensaio cometa na detecção de danos genômicos torna a técnica aplicável para as mais distintas finalidades. Na toxicologia genética, sua aplicação na observação do potencial genotóxico das mais diferentes substâncias, o torna uma ferramenta muito empregada (PIPERAKIS, 2009). No campo da toxicologia ambiental, é uma das principais técnicas para detectar efeitos ecogenotóxicos dos mais diferentes poluentes ambientais, sejam esses sólidos como nanopartículas (LIMAN, 2013), rejeitos de mineradoras (FREITAS et al., 2016; PALMIERI et al., 2016), gasosos como os emitidos por indústrias (FERETTI et al., 2019), líquidos como os pesticidas (LIMAN; CIĞERCI; ÖZTÜRK, 2015; ARAGÃO et al., 2019), etc. Alguns estudos podem ser citados nesse sentido como a aplicação do ensaio cometa em *Allium cepa*, utilizado para verificar os efeitos genotóxicos do herbicida imazetapir. A técnica se mostrou eficaz na detecção dos danos que se mostraram mais elevados em comparação aos controles (LIMAN; CIĞERCI; ÖZTÜRK, 2015). Ainda, a avaliação de solos tropicais contaminados com arsênio foi conduzida, empregando o ensaio cometa em *Allium cepa*, bem como, a análise de ciclo celular no mesmo modelo. Os autores observaram concentrações desse metalóide que causaram clastogenicidade e efeito citotóxicos nas células observadas (ALVARENGA et al., 2020).

Os efeitos do rejeito da indústria de alumínio, *Spent Pot Liner* (SPL), foram avaliados quanto aos seus efeitos sobre o genoma do modelo vegetal *Allium cepa* e paralelamente em linfócitos de sangue total, sendo observados aumentos nos níveis de alterações cromossômicas e nucleares em função da exposição aos principais componentes do SPL. Adicionalmente, o teste do cometa em linfócitos de sangue total corroborou o observado em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, apresentando níveis significativos de danos genômicos para estes compostos (PALMIERI et al., 2016). O dióxido de titânio se mostrou genotóxico tanto para as células meristemáticas de *Allium cepa* quanto para linfócitos humanos. Especificamente foram usadas técnicas de avaliação de danos genômicos como o teste do cometa obtendo-se a confirmação da genotoxicidade das nanopartículas desse metal (GHOSH; BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2010). A genotoxicidade de misturas de metais pesados Cádmio/Chumbo foi também verificada em outro estudo e em paralelo, os autores avaliaram

dados morfológicos de crescimento. Os modelos empregados foram as espécies vegetais *Brassica oleracea* e *Trifolium repens*. O teste do cometa revelou danos no DNA dependo da concentração e tempo de exposição aos metais e suas misturas (LANIER et al., 2019).

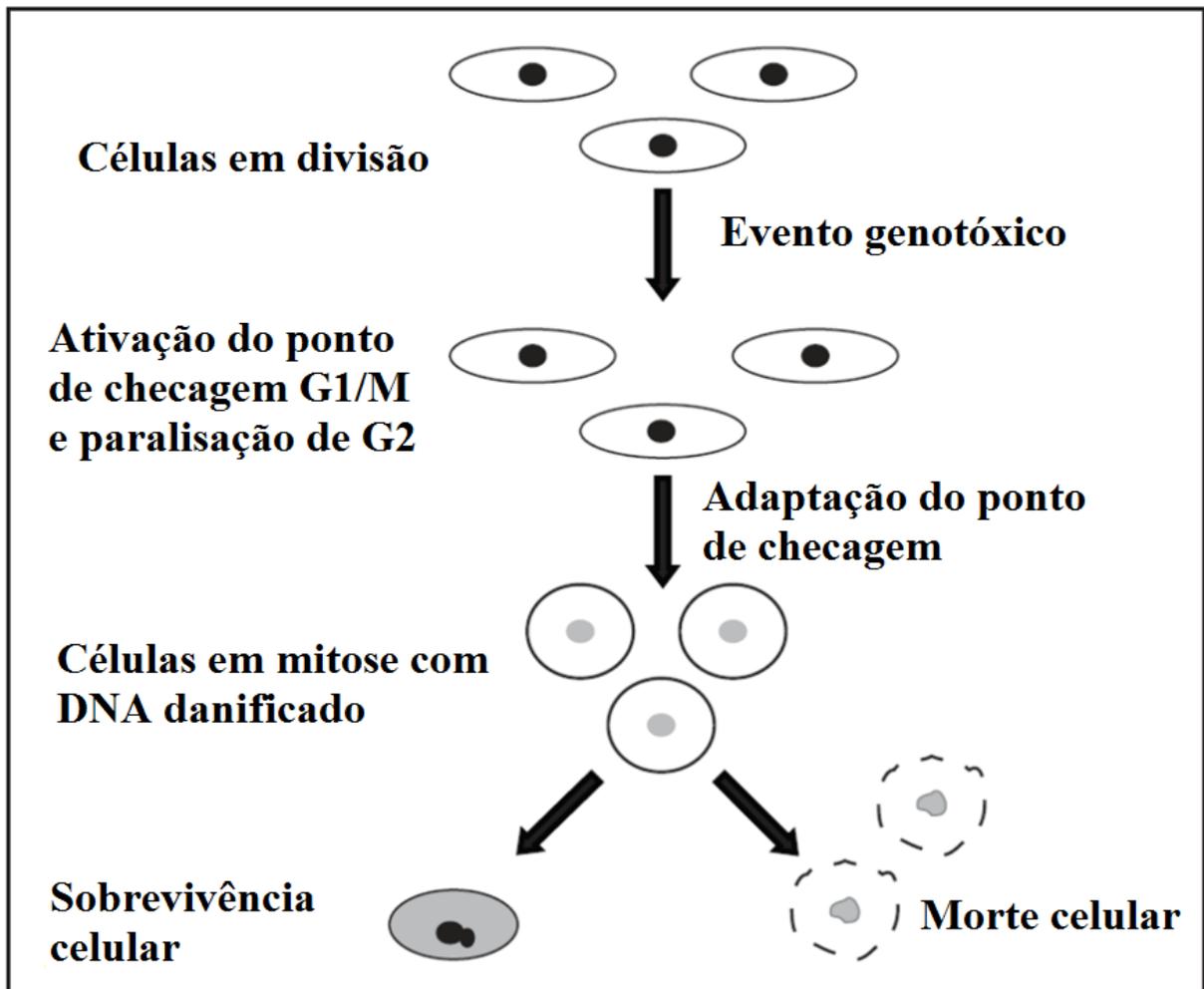
3.2 Quebras na molécula de DNA, alterações cromossômicas e mutagenicidade

O ciclo celular é uma sequência organizada de eventos compreendidos pela interfase (etapas G1, S e G2) e pela fase da mitose propriamente dita comumente chamada de fase M (sendo suas fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase) (ALBERTS et al., 2017). Na interfase, cada uma de suas etapas se configura como um estágio em que a célula entra em preparação, onde eventos como duplicação de organelas celulares, duplicação do material genômico, crescimento celular ocorrem. Na fase M, reguladores específicos atuam indicando o momento adequado para a divisão celular, sendo cada etapa bem regulada pelas enzimas quinases dependentes de ciclina (Ciclina-CDK) (LIM; KALDIS, 2013).

A progressão do ciclo celular depende da checagem da integridade do genoma, com a atuação de proteínas conhecidas como “guardiãs do genoma”, como é o caso da Rb, P53, evitando que erros no DNA sejam passados para a próxima geração de células (LIM; KALDIS, 2013). A presença de quebras na molécula de DNA estimula a expressão dos genes que codificam tais proteínas. A proteína p53 pode atuar de diferentes formas, sobretudo, nos pontos de checagem (*checkpoints*) relacionados a danos no DNA e em diferentes vias de reparo dessa molécula (WILLIAMS; SCHUMACHER, 2016). Assim, danos e erros no DNA são reparados ou não. No caso em que as células com material genético defeituoso não corrigem esses defeitos, a apoptose (ou morte celular programada) (MUKHTAR et al., 2016) impede que essas mantenham-se, evitando que células filhas com erros em seu material genético sejam originadas (HAMPP et al., 2016).

Tais reguladores descritos acima são conhecidos de maneira geral como *checkpoints* celulares, controlados por ciclinas específicas, ocorrendo principalmente em G1, G1/S, G2, na fase M e pelas proteínas guardiãs. Contudo, nem sempre essa regulação é efetiva e células com material genético defeituoso podem se manter, propagando-se (SWIFT; GOLSTEYN, 2014) e mesmo acumulando mutações (ZHANG; FLEMINGTON; ZHANG, 2016) conforme exemplificado na figura 1.

Figura 1 – Representação da atuação dos pontos de checagem celular frente a um evento genotóxico



Fonte: Adaptado de Swift e Golsteyn (2014).

O ciclo celular é um processo dinâmico em que cada uma de suas fases ocorre simultaneamente e em consonância com as demais (ALBERTS et al., 2017). Em função dos efeitos de diversos agentes, sejam esses, físicos, químicos e mesmo biológicos, direta ou indiretamente, as consequências advindas desses agentes podem ser observadas ao longo do ciclo celular e, em especial, na fase M. Esses efeitos causados por esses agentes podem ser classificados em clastogênicos e aneugênicos (ANDRADE-VIEIRA; SILVEIRA, 2018).

Efeitos clastogênicos se referem aqueles que originam quebras e rearranjos no DNA ou cromossomos (ANDRADE-VIEIRA; SILVEIRA, 2018). As quebras podem ser em uma das fitas da molécula de DNA (quebras simples) ou em ambas as fitas (quebras duplas), onde parte das quebras da fita simples são frequentemente convertidas em quebras na dupla fita (JAIN et

al., 2017). Altos níveis de clastogenicidade levam a mutações que são observadas como alterações cromossômicas (EMERIT, 1994). Os efeitos aneugênicos são aqueles que se relacionam com alterações no número cromossômico, sendo comumente associados com inibição da polimerização de fibras do fuso mitótico ou do não attachment correto dessas no cinetócoro presente na região centromérica dos cromossomos. Como consequência, promovem a perda ou ganho de um ou mais cromossomos (ANDRADE-VIEIRA; SILVEIRA, 2018).

Os efeitos clastogênicos e aneugênicos podem ser induzidos por agentes físicos, químicos e biológicos, tais como radiação (BLANK; GOODMAN, 2011; KUMAR et al., 2020) e substâncias xenobióticas diversas (ALVES et al., 2018; CARVALHO et al., 2019), como metais, toxinas (REYNOLDS et al., 2012; WISE et al., 2016; PALMIERI et al., 2019; ALVARENGA et al., 2020) e pesticidas (SILVEIRA et al., 2017; LUKASZEWICZ et al., 2019).

Muito embora alguns dos efeitos observados já tenham sido causados no DNA celular quando a célula estava em interfase (PALMIERI et al., 2016), as consequências de certos agentes indutores de efeitos clastogênicos e aneugênicos, são melhores visualizadas em algumas das fases do ciclo celular. Como por exemplo, na metáfase, em que os cromossomos apresentam-se em sua forma mais condensada e agrupados na placa metafásica. Exemplos de alterações observadas na metáfase podem ser as c-metáfases, os cromossomos não orientados e as metáfases poliplóides. Por estarem associadas com a inibição da polimerização dos microtúbulos ou de seu não attachment no cinetócoro essas alterações são classificadas como aneugênicas (ANDRADE-VIEIRA; SILVEIRA, 2018).

Em outras fases da divisão celular algumas dessas alterações cromossômicas são observadas também. Na anáfase, as fibras do fuso mitótico devem estar polimerizadas, bem como o attachment dessas nos cromossomos, o que propicia que os cromossomos migrem para polos distintos da célula e a segregação cromossômica prossiga. Nessa fase algumas alterações cromossômicas aneugênicas podem ser observadas como a anáfase multipolar e a anáfase atrasada. Ainda, é possível que micronúcleos sejam observados nessa fase (ANDRADE-VIEIRA; SILVEIRA, 2018). Os micronúcleos são originados pela perda de partes ou de cromossomos inteiros (RUSSO; DEGRASSI, 2018).

Além disso, na anáfase, é possível ser observado outro fenômeno associado a alterações clastogênicas relacionadas a quebra do telômero das cromátides, tornando-as capazes de se fundirem pelas extremidades. Por conseguinte, braços de cromossomos fragmentados na região telomérica podem se fundir, originando cromossomos dicêntricos (com duas regiões

centroméricas e dois cinetócoros). Esses cromossomos são então passíveis de serem capturados por fibras de fusos mitóticos de polos opostos. Nesse caso, esses cromossomos são tensionados entre os polos da célula, sendo observado a figura de uma ponte entre os polos. As regiões cromossômicas sem centrômeros são caracterizadas por cromossomos acêntricos originados da quebra do braço cromossômico, causando a perda de material genético. Como consequência, esses cromossomos provavelmente serão perdidos (BIRCHLER; HAN, 2018) ou formarão micronúcleos (RUSSO; DEGRASSI, 2018).

Ademais, pode ocorrer a continuidade do que é conhecido como ciclo de quebra-fusão-ponte (QFP), uma vez que mais cromossomos sem suas regiões centroméricas continuem a ser gerados. Este ciclo foi mostrado nos anos 1930 pela pesquisadora Barbara McClintock ao estudar os cromossomos de amostras de milho irradiado. Seus estudos demonstraram que rearranjos cromossômicos podem ser originados por esse meio, como é o caso da inversão, devido a instabilidade gerada pela perda da região telomérica (MCCLINTOCK, 1978; BIRCHLER; HAN, 2018).

3.3 Agentes citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos

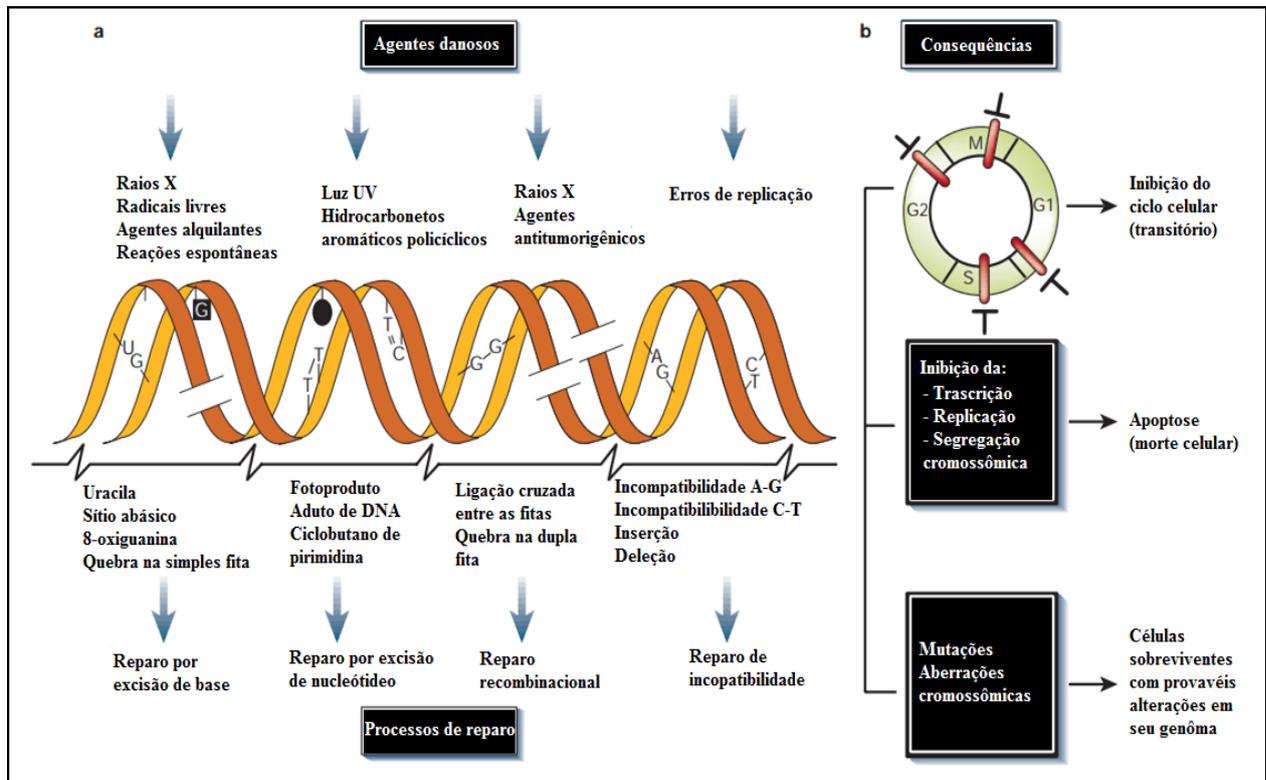
Um amplo espectro de agentes pode ser responsável pelos mais diferentes efeitos em células. Dentre esses, temos aqueles que reduzem o crescimento celular afetando diretamente a quantidade de células viáveis por diferentes mecanismos. A taxa de divisão celular em plantas leva em conta a quantidade de células em divisão (quantas dessas estão em uma das fases do ciclo celular, prófase, metáfase, anáfase e telófase), pelo total de células contadas. Um agente, portanto, que é capaz de atuar reduzindo a quantidade de células que estão se dividindo é dito citotóxico. Os mecanismos responsáveis pela citotoxicidade podem ser aqueles que atuam comprometendo a integridade da membrana celular, inibindo rotas metabólicas associadas a produção de energia ou afetando o DNA direta ou indiretamente (SALIH ISTIFLI; TAHIR HÜSUNET; BASRI ILA, 2019). No último caso, esses mecanismos podem inibir a síntese do DNA ou seus precursores e, portanto, proteínas resultantes da sua expressão. Paralelamente, a indução de apoptose, no caso de células animais (HOEIJMAKERS, 2001; SALIH ISTIFLI; TAHIR HÜSUNET; BASRI ILA, 2019) ou morte celular programada no caso de células vegetais (MUKHTAR et al., 2016) pode ser desencadeada em função da inviabilidade da célula em se manter frente aos danos sofridos.

Os agentes causadores de danos no DNA podem ser endógenos, quando oriundos de processos próprios dos organismos, como a defesa contra patógenos onde respostas associadas

a liberação de radicais livres são geradas, ou mesmo, em função do metabolismo. Os agentes exógenos estão frequentemente no ambiente e podem se constituir de químicos presentes na água e no ar, por exemplo. Ainda, indutores de danos podem ser físicos, como a radiação ionizante (raios ultravioleta, raios-x, etc.) (SWIFT; GOLSTEYN, 2014). A formação de ligações cruzadas na molécula de DNA pode ser responsável por quebras nessa molécula, caso essas não sejam reparadas pelos mecanismos celulares. Alguns agentes como intercalantes e alquilantes de DNA são capazes de produzir ligações entre as bases nitrogenadas presentes na molécula de DNA ou mesmo entre ambas as fitas da molécula, impedindo que eventos importantes para a célula, como etapas de transcrição, replicação e a segregação cromossômica sejam concluídas, levando a morte celular (HOEIJMAKERS, 2001). Essas ligações podem originar quebras na molécula de DNA, inviabilizando tais células, que não se mantêm em função da regulação existente durante o ciclo celular. Tais ligações são conhecidas, de outra forma, por formarem adutos covalentes com o DNA.

Os agentes capazes de causar o entrelaçamento de ligações cruzadas no DNA podem ser monofuncionais, que causam predominantemente substituições nos pares de bases, configurando-se como mutagênicos. Os agentes que são ditos bifuncionais são capazes de causar deleções cromossômicas, sendo notadamente clastogênicos (NOLL; MCGREGOR MASON; MILLER, 2006). O estresse oxidativo, causado por radicais livres ou agentes capazes de gerar radicais livres produzem, majoritariamente, danos causados por ligações cruzadas do tipo DNA-proteína, quebras nas dupla e simples fitas e danos em bases nitrogenadas (AHSAN; ALI; ALI, 2003). Apresentando, dessa maneira, efeito clastogênico e mutagênico (JAIN et al., 2017). A figura 2 traz os principais agentes responsáveis por alterações na molécula de DNA, seus efeitos, processos de reparo que são desencadeados e consequências para a célula.

Figura 2 –Agentes danosos para o DNA e seus efeitos, processos de reparo e consequências



Fonte: Adaptado de HOEIJMAKERS, 2001.

3.4 Detecção de danos no DNA pelo ensaio cometa

O teste do cometa ou eletroforese em gel de célula única é uma técnica utilizada para detecção de danos ao DNA. É caracterizada por ser uma técnica sensível e específica, que tem sido utilizada para detectar um amplo espectro de danos no material genético (YILDIZ, 2009; AZQUETA et al., 2011a). Existem duas versões da técnica, em que a solução de corrida eletroforética possui pH alcalino ou neutro. Na primeira técnica, danos em apenas uma das fitas do DNA são detectados. A versão neutra detecta danos decorrentes de quebras em ambas as fitas da molécula DNA (PIPERAKIS, 2009).

Com a imersão de células em soluções com tratamentos contendo detergentes e alta concentração salina, a membrana, citoplasma, carioteca, nucleoplasma, proteínas são removidos. O que resta é chamado nucleóide que consiste na matriz nuclear, com proteínas, RNA e DNA em uma estrutura conhecida como escafóide. O DNA super enovelado é afrouxado pela sua exposição ao pH altamente alcalino ($\text{pH} > 13$) da solução eletroforética, tornando os fragmentos nas regiões álcali lábeis suscetíveis a corrida em gel de agarose (PIPERAKIS, 2009). Diferente das células animais, as células vegetais possuem parede celular, sendo

necessária a remoção dessa para que os nucleóides sejam isolados (GICHNER et al., 2009; POURRUT et al., 2015).

O desenvolvimento da técnica remonta a primeira tentativa de quantificação de danos genômicos, a partir de nucleóides obtidos a partir de células animais (hamster chinês), no ano de 1978 por Rydberg e Jonhanson (RYDBERG; JOHANSON, 1978). Em 1984, com base na técnica anteriormente descrita, Ostling e Jonhanson desenvolveram a técnica de eletroforese em célula única, conhecida atualmente como ensaio cometa (OSTLING; JOHANSON, 1984). Em 1988, Singh e colaboradores foram responsáveis por aumentar a sensibilidade da técnica em duas vezes mais que a técnica previamente descrita (SINGH et al., 1988).

Sob condições alcalinas de eletroforese, o DNA que sofreu danos apresenta maior taxa de migração em direção ao ânodo, devido a quebras de fita simples ou duplas e sítios álcali lábeis aparentando similaridade com um cometa, caracterizado por uma cabeça (DNA íntegro) e cauda (DNA fragmentado). Assim, lesões no DNA que envolvam a formação de quebras aumentam a migração do DNA, enquanto que lesões associadas a formação de ligações cruzadas do tipo DNA-DNA ou DNA-proteína retardam a migração (PIPERAKIS, 2009).

Outros estudos ratificam a eficiência do ensaio cometa em diferentes modelos vegetais e animais, como os citados a seguir. O ensaio cometa foi empregado em estudo utilizando linfócitos humanos, no qual os danos induzidos pelos herbicidas da classe das dinitroanilinas, pendimetalina e trifluralina foram atribuídos ao estresse oxidativo e a fragmentação cromossômica (SARIGÖL KILIÇ et al., 2018). A avaliação do herbicida glifosato, seus componentes e o seu metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA), utilizando para tanto, células do modelo animal zebrafish (*Danio rerio*), foi também feita empregando a técnica cometa. Os pesquisadores concluíram que esses compostos foram genotóxicos até mesmo nas concentrações mais baixas (RODRIGUES et al., 2019). Em estudo comparativo, utilizando os modelos vegetais *Allium cepa* e *Lactuca sativa*, os autores utilizaram o ensaio cometa, análise de ciclo celular e o teste TUNEL em associação com dados macroscópicos de crescimento inicial (comprimento de radículas e parte aérea) objetivando avaliar as respostas a poluentes ambientais dos dois modelos. Como indutores de danos foram utilizados o Metil Metanosulfonato (MMS), o rejeito da indústria de alumínio SPL, o metal pesado cádmio e o herbicida atrazina. O ensaio cometa, em ambos os modelos vegetais, se mostrou em concordância com os demais testes usados (SILVEIRA et al., 2017).

Como citado acima, o ensaio cometa pode ser utilizado para complementar os dados citogenotóxicos e de mutagênese celular, citometria de fluxo e marcadores moleculares, pois

detecta lesões genômicas causadas no DNA em decorrência da ação de compostos genotóxicos e mutagênicos. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção.

3.5 O ensaio cometa: Padronizações, adaptações e otimizações

Desde sua criação por Rydeberg e Jonhanson em 1978 o ensaio cometa sofreu uma série de padronizações, melhorias e adaptações para os mais diferentes tipos celulares, procariotos, eucariotos, animais, invertebrados e vertebrados, e modelos vegetais (RYDBERG; JOHANSON, 1978; LANIER et al., 2015; DHAWAN; ANDERSON, 2016). A adaptação da técnica para o modelo vegetal data do ano de 1991 (CERDA; HOFSTEN; JOHANSON, 1993; LANIER et al., 2015). A partir de então, uma série de modificações vem sendo realizadas no ensaio cometa objetivando aumentar sua confiabilidade ou para fins específicos. Uma variação da técnica é conhecida como cometa acelular, em que apenas os nucleóides após isolamento são expostos aos agentes potencialmente genotóxicos, visando avaliar danos da exposição direta desses ao DNA (GICHNER, 2003; BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2011). Associação do ensaio cometa com a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é outro exemplo de modificação. Associando as duas técnicas é possível determinar quais regiões foram danificadas após exposição a determinado agente, uma vez que na FISH, anticorpos com sondas fluorescentes com especificidade para determinadas regiões são produzidos, buscando a marcação dessas regiões (RAPP; HAUSMANN; GREULICH, 2005). Estudos relacionados a reparo de DNA são frequentemente conduzidos, nessa abordagem os organismos modelos ou suas células em cultura são expostos aos agentes potencialmente genotóxicos e/ou proporções de algum composto potencialmente antigenotóxico (ERIKEL; YUZBASIOGLU; UNAL, 2019; ŽIVKOVIĆ et al., 2019)

Contudo, a variação nos resultados obtidos pelo teste, ainda é um fator que sugere a necessidade de que protocolos mais reprodutíveis sejam definidos (COLLINS et al., 2014). Alguns parâmetros que se mostram cruciais, mas que apresentam grande influência na variabilidade referem-se as especificidades das diferentes metodologias para obtenção das lâminas a serem avaliadas. A variabilidade no ensaio cometa é uma questão importante e que já foi objeto de estudo, demonstrando que parâmetros como concentração do gel de agarose de baixo ponto de fusão, tempo de imersão na solução altamente alcalina usada para a corrida eletroforética, voltagem empregada durante a corrida e o tempo de corrida, são fatores que exigem atenção para que as metodologias sejam bem executadas e com resultados confiáveis

(AZQUETA et al., 2011a; COLLINS et al., 2014). Portanto, a adaptação do ensaio em diferentes tipos celulares, requer que esses parâmetros sejam revistos e ajustados para que a confiabilidade e reprodutibilidade do ensaio sejam mantidas.

Outro fator que se mostra associado a variabilidade do ensaio do cometa é associado as metodologias de avaliação das lâminas para a observação de danos observados. As metodologias de avaliação dos danos podem ser por escore visual, semi automatizadas ou automatizadas. O escore visual consiste na classificação e contagem de nucleóides, classificando-os em níveis de danos, em geral de 0 a 4 por um operador (AZQUETA et al., 2011b). Em seguida, são atribuídos pesos à cada classe, sendo esses multiplicados pelo número de nucleóides encontrados em cada classe, esse método quantifica e qualifica os danos observados e é conhecido como unidades arbitrárias. As unidades arbitrárias variam de 0-400, sendo o valor mínimo 0 quando todos os nucleóides foram classificados como sem danos e 400 com nível máximo de dano (COLLINS, 2004).

Na quantificação semi automatizada, o gel é escaneado, as imagens são selecionadas pelo operador e a contagem é feita com auxílio de algum software que classifica os nucleóides observados em diferentes medidas, tais quais porcentagem de DNA na calda ou cabeça, momento de calda, dentre outras. A metodologia de quantificação automatizada, classifica todos os nucleóides na imagem do gel escaneado, sem a intervenção de um operador, o que pode gerar diferenças entre as replicatas (lâminas de cada tratamento) uma vez que o software quantifica todos os nucleóides existentes em cada imagem (AZQUETA et al., 2011b).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de o ensaio cometa ser um dos testes mais utilizados para avaliação de efeitos genotóxicos das mais diversas substâncias, a variabilidade presente no ensaio é um viés que deve ser explorado, buscando reduzir deficiências durante a execução de protocolos, sobretudo na padronização em outras condições que não aquelas descritas em protocolos pré-determinados. Neste estudo, alguns desses parâmetros, para o ensaio cometa aplicado ao modelo vegetal *Lactuca sativa*, puderam ser definidos. Para tanto, algumas variações metodológicas foram estudadas experimentalmente, dentro de cada parâmetro, sendo estas: quantidade de raízes, tempo de maceração e realização desta na presença ou ausência de luz e gelo, exposição ou não a solução de lise, tempo de imersão em solução de eletroforese (alcalina), voltagem empregada durante a corrida eletroforética, e diferentes indutores químicos de danos (descritos em literatura como controles para o teste cometa em modelo vegetal). Nesse

contexto, os resultados do presente trabalho serão de grande importância científica, uma vez que trarão informações que permitam obter, para o teste cometa em células radiculares de *Lactuca sativa*, maior número de nucleóides, maior uniformidade na morfologia dos nucleóides dentro das replicatas e confiabilidade dos resultados - reduzindo os custos experimentais, menor tempo de análise, permitindo sobretudo, minimizar as discrepâncias atualmente observadas entre os resultados de diferentes grupos de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. **Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology***, 2003. . doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02104.x.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WILSON, J.; WALTER, P.; HUNT, T. **Biologia Molecular da Célula**. 6 ed. [s.l.: s.n.]
- ALVARENGA, I. F. S.; DOS SANTOS, F. E.; SILVEIRA, G. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; MARTINS, G. C.; GUILHERME, L. R. G. Investigating arsenic toxicity in tropical soils: A cell cycle and DNA fragmentation approach. **Science of the Total Environment**, v. 698, 2019. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134272.
- ALVES, T. A.; PINHEIRO, P. F.; PRAÇA-FONTES, M. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CORRÊA, K. B.; ALVES, T. A.; CRUZ, F. A.; LACERDA JÚNIOR, V.; FERREIRA, A.; SOARES, T. C. B. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. **Industrial Crops and Products**, v. 114, p. 59–67, 2018. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.071.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BERNARDES, P. M.; FERREIRA, M. F. da S. Mutagenic effects of spent potliner and derivatives on *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L.: A molecular approach. **Chemosphere**, v. 208, p. 257–262, 2018.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; SILVEIRA, G. L. Cyto(Geno)Toxic Endpoints Assessed via Cell Cycle Bioassays in Plant Models. In: **Cytotoxicity**. [s.l.] InTech, 2018.
- ARAGÃO, F. B.; BERNARDES, P. M.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. da S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B. Cyto (geno) toxicity of Commercial Fungicides Based on the Active Compounds Tebuconazole , Difenoconazole , Procymidone , and Iprodione in *Lactuca sativa* L . Meristematic Cells. **Water Air Soil Pollut**. v. 698, n. 25, 2019.
- AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Towards a more reliable comet assay : Optimising agarose concentration , unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1–2, p. 41–45, 2011a. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.05.010.
- AZQUETA, A.; MEIER, S.; PRIESTLEY, C.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 393–399, 2011b. doi: 10.1093/mutage/geq105.
- BANDYOPADHYAY, A.; MUKHERJEE, A. Sensitivity of *Allium* and *Nicotiana* in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 860–865, 2011. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.12.002.
- BARAGAMAARACHCHI, Y. R.; WEEARASENA, O. V. D. S. J.; HANDUNNETTI, S. M.; SAMARASEKARA, R. Recommendations to enhance reproducibility and reliability in comet assay. **4th Global Summit on Toxicology Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 4172, 2015.

BIRCHLER, J. A.; HAN, F. Barbara McClintock ' s Unsolved Chromosomal Mysteries : Parallels to Common Rearrangements and Karyotype Evolution. **Plant cell**. v. 30, n. 4, p. 771-779, 2018. doi: 10.1105/tpc.17.00989.

BLANK, M.; GOODMAN, R. DNA is a fractal antenna in electromagnetic fields. **International Journal of Radiation Biology**, v. 87, n. 4, p. 409–415, 2011. doi: 10.3109/09553002.2011.538130.

BRUNBORG, G.; ROLSTADAAS, L.; GUTZKOW, K. B. Electrophoresis in the Comet Assay. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.

CABUGA JR, C. C.; JOY ABELADA, J. Z.; ROSE APOSTADO, R. Q.; JOY HERNANDO, B. H.; ERICK LADOR, J. C.; LLOYD OBENZA, O. P.; JAMES PRESILDA, C. R.; HAVANA, H. C. *Allium cepa* test: An evaluation of genotoxicity. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 7, n. 1, p. 12–19, 2017.

CARVALHO, M. S. S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; SANTOS, F. E. ; CORREA, F. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, L. R. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 90–98, 2019. doi: 10.1016/j.scienta.2018.10.001.

CERDA, H. v; HOFSTEN, B. V; JOHANSON, K. J. Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells. **Recent advances on detection of irradiated food**, p. 401–405, 1993.

CHANG, C.; BOWMAN, J. L.; MEYEROWITZ, E. M. Field Guide to Plant Model Systems. **Cell Press**, v. 167, n. 2. p. 325-339, 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.031.

COLLINS, A. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, 2004.

COLLINS, A. R.; EL YAMANI, N.; LORENZO, Y.; SHAPOSHNIKOV, S.; BRUNBORG, G.; AZQUETA, A. Controlling variation in the comet assay. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. SEP, p. 1–6, 2014. doi: 10.3389/fgene.2014.00359.

DHAWAN, A.; ANDERSON, D. The comet assay in toxicology. [2 nd ed] ed. [s.l.] **Royal Society of Chemistry**, 2016.

EMERIT, I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, 1994. . doi: 10.1016/0891-5849(94)90246-1.

ENCISO, J. M.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; OLSEN, A. K.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; AZQUETA, A. Standardisation of the in vitro comet assay: Influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 25–30, 2018. doi: 10.1093/mutage/gex039.

ERIKEL, E.; YUZBASIOGLU, D.; UNAL, F. In vitro genotoxic and antigenotoxic effects of

cynarin. **Journal of Ethnopharmacology**, 2019. doi: 10.1016/j.jep.2019.03.036.

FERETTI, D.; PEDRAZZANI, R.; CERETTI, E.; DAL GRANDE, M.; ZERBINI, I.; VIOLA, G. C. V.; GELATTI, U.; DONATO, F.; ZANI, C. “Risk is in the air”: Polycyclic aromatic hydrocarbons, metals and mutagenicity of atmospheric particulate matter in a town of Northern Italy (Respira study). **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 35–49, 2019. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.11.002.

FREITAS, A. S.; FONTES CUNHA, I. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 426–434, 2016. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.017.

GARCIA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. v. 556, p. 25–34, 2004. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.035.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. **Chemosphere**, v. 81, n. 10, p. 1253–1262, 2010. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.022.

GICHNER, T. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco: Cellular and acellular Comet assays. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 535, n. 2, p. 187–193, 2003. doi: 10.1016/S1383-5718(02)00320-0.

GICHNER, T.; PTÁČEK, O.; STAVREVA, D. A.; PLEWA, M. J. Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 1999. doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(1999)33:4<279::AID-EM4>3.0.CO;2-K.

GICHNER, T.; ZNIDAR, I.; WAGNER, E. D.; PLEWAC, M. J. The use of higher plants in the Comet assay. **Issues in Toxicology**, 2009. doi: 10.1039/9781847559746-00098.

GLEI, M.; HOVHANNISYAN, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 33–43, 2009. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.01.006.

HAMPP, S.; KIESSLING, T.; BUECHLE, K.; MANSILLA, S. F.; THOMALE, J.; RALL, M.; AHN, J.; POSPIECH, H.; GOTTIFREDI, V.; WIESMÜLLER, L. DNA damage tolerance pathway involving DNA polymerase ι and the tumor suppressor p53 regulates DNA replication fork progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 30, p. E4311–E4319, 2016. doi: 10.1073/pnas.1605828113.

HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**. v. 411, p. 366-374, 2020. doi.org/10.1038/35077232.

JAIN, A. K.; SINGH, D.; DUBEY, K.; MAURYA, R.; PANDEY, A. K. Chromosomal

aberrations. In: **Mutagenicity: Assays and Applications**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 69–92.

JOVTCHEV, G.; MENKE, M.; SCHUBERT, I. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 493, n. 1-2, , p. 95-100, 2001. doi: 10.1016/S1383-5718(01)00166-8.

KAWANISHI, M.; MATSUDA, T.; YAGI, T. Genotoxicity of formaldehyde : molecular basis of DNA damage and mutation. **Front. Environ. Sci.** v. 2, n. 36, p. 1–8, 2014. doi: 10.3389/fenvs.2014.00036.

KOPPEN, G.; AZQUETA, A.; POURRUT, B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R.; LANGIE, S. A. S. The next three decades of the comet assay: A report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 32, n. 3, p. 397–408, 2017. doi: 10.1093/mutage/gex002.

KUMAR, A.; KAUR, S.; CHANDEL, S.; PAL, H.; RANI, D.; KUMAR, R. Ecotoxicology and Environmental Safety Comparative cyto- and genotoxicity of 900 MHz and 1800 MHz electromagnetic field radiations in root meristems of *Allium cepa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, p. 109786, 2020. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109786.

LANIER, C.; BERNARD, F.; DUMEZ, S.; LECLERCQ-DRANSART, J.; LEMIÈRE, S.; VANDENBULCKE, F.; NESSLANY, F.; PLATEL, A.; DEVRED, I.; HAYET, A.; CUNY, D.; DERAM, A. Combined toxic effects and DNA damage to two plant species exposed to binary metal mixtures (Cd/Pb). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 278–287, 2019. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.010.

LANIER, C.; MANIER, N.; CUNY, D.; DERAM, A. The comet assay in higher terrestrial plant model: Review and evolutionary trends. **Environmental Pollution**, v. 207, p. 6–20, 2015. doi: 10.1016/j.envpol.2015.08.020.

LEE, M. Y.; KIM, M. A.; KIM, H. J.; BAE, Y. S.; PARK, J. I.; KWAK, J. Y.; CHUNG, J. H.; YUN, J. Alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) induces a wave of global protein hyperacetylation: Implications in cancer cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 360, n. 2, p. 483–489, . 2007. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.084.

LI, R.; LU, Z. S.; QIAO, Y.; YAO, H. C.; YU, F. F.; YANG, X. [Study on the formaldehyde-induced DNA damage with comet assay]. **Shi yan sheng wu xue bao**, v. 37, n. 4, p. 262–8, 2004.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. **Development (Cambridge)**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, 2013. doi: 10.1242/dev.091744.

LIMAN, R. Chemosphere Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 269–273, 2013. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.076.

LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration,

and comet assay. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 118, p. 38–42, 2015. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.11.007.

LUKASZEWICZ, G.; ITURBURU, F. G.; GARANZINI, D. S.; MENONE, M. L.; PFLUGMACHER, S. Imidacloprid modifies the mitotic kinetics and causes both aneugenic and clastogenic effects in the macrophyte *Bidens laevis* L. **Heliyon**, v. 5, n. 7, e02118, 2019. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02118.

MA, T. H.; HARRIS, M. M. Review of the genotoxicity of formaldehyde. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 196, n. 1, p. 37–59, 1988. doi: 10.1016/0165-1110(88)90027-9.

MA, T.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; VALTIERRA, E.; ADRIANA, G.; ZHANG, H. The improved *Allium* / *Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat Res.** v. 334, n. 2, p. 185–195, 1995.

MCCLINTOCK, B. Mechanisms that rapidly reorganize the genome. **In: Stadler genetics symposium , University of Missouri.** v. 10, 1978.

MERK, O.; SPEIT, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 33, n. 2, p. 167–72, 1999. doi: 10.1002/(sici)1098-2280(1999)33:2<167::aid-em9>3.0.co;2-d.

MUKHTAR, M. S.; MCCORMACK, M. E.; ARGUESO, C. T.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. M. Pathogen Tactics to Manipulate Plant Cell Death. **Current Biology**, v. 26, n. 13, p. R608–R619, 2016. doi: 10.1016/j.cub.2016.02.051.

NOLL, D. M.; MCGREGOR MASON, T.; MILLER, P. S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 2, p. 277-301, 2006. doi: 10.1021/cr040478b.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984. doi: 10.1016/0006-291X(84)90411-X.

PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TRENTO, M. V. C.; ELEUTÉRIO, M. W. F.; LUBER, J.; DAVIDE, L. C.; MARCUSSI, S. Cytogenotoxic Effects of Spent Pot Liner (SPL) and Its Main Components on Human Leukocytes and Meristematic Cells of *Allium cepa*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 5, 2016. doi: 10.1007/s11270-016-2809-z.

PALMIERI, M. J.; BARROSO, A. R.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; MONTEIRO, M. C.; SOARES, A. M.; CESAR, P. H. S.; BRAGA, M. A.; TRENTO, M. V. C.; MARCUSSI, S.; DAVIDE, L. C. *Polybia occidentalis* and *Polybia fastidiosa* venom : a cytogenotoxic approach of effects on human and vegetal cells of effects on human and vegetal cells. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2019. doi: 10.1080/01480545.2019.1631339.

PIPERAKIS, S. M. Comet assay: A brief history. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 1-3, 2009. doi: 10.1007/s10565-008-9081-y.

POURRUT, B.; PINELLI, E.; MENDIOLA, V. C.; SILVESTRE, J.; DOUAY, F.

Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 37–43, 2015. doi: 10.1093/mutage/geu075.

RAPP, A.; HAUSMANN, M.; GREULICH, K. O. The comet-FISH technique: a tool for detection of specific DNA damage and repair. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 291, n. 5, p. 107–119, 2005. doi: 10.1385/1-59259-840-4:107.

REIS, G. B.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; MORAES, I. C.; CÉSAR, P. H. S.; MARCUSSI, S.; DAVIDE, L. C. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 110–116, 2017. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.04.004.

REYNOLDS, M.; ARMKNECHT, S.; JOHNSTON, T.; ZHITKOVICH, A. Undetectable role of oxidative DNA damage in cell cycle, cytotoxic and clastogenic effects of Cr(VI) in human lung cells with restored ascorbate levels. **Mutagenesis**, v. 27, n. 34, p. 437-443, 2012. doi: 10.1093/mutage/ger095.

RODRIGUES, L.B. ; COSTA, G. G.; THÁ, E. L.; SILVA, L. R.; OLIVEIRA, R.; LEME, D. M.; CESTARI, M. M.; GRISOLIA, C. K.; VALADARES, M. C.; OLIVEIRA, G. A. R. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 94-101, 2019. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.05.002.

RUSSO, A.; DEGRASSI, F. Molecular cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. **Mutat Res Gen Tox En**. v. 836, p. 36–40, 2018.

RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. **DNA Repair Mechanisms**, p. 465–468, 1978. doi: 10.1016/B978-0-12-322650-1.50090-4.

SALIH ISTIFLI, E.; TAHIR HÜSUNET, M.; BASRI ILA, H. Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity. In: **Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

SANTOS, F. E.; CARVALHO, M. S. S.; SILVEIRA, G. L.; CORREA, F. F.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; VILELA, L. R. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 27, p. 27558–27568, 2019. doi: 10.1007/s11356-017-1015-x.

SARIGÖL KILIÇ, Z.; AYDIN, S.; ÜNDEĞER BUCURGAT, Ü.; BAŞARAN, N. In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 90–98, 2018. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.034.

SHAPOSHNIKOV, S. A.; SALENKO, V. B.; BRUNBORG, G.; NYGREN, J.; COLLINS, A. R. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): Loops of fragments? **Electrophoresis**, v. 29, n. 14, p. 3005–3012, 2008. doi: 10.1002/elps.200700921.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B. dos; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using

Allium cepa L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, 2017. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.048.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 1841-191, 1988. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3403-3431, 2014. doi: 10.3390/ijms15033403.

WILLIAMS, A. B.; SCHUMACHER, B. p53 in the DNA-damage-repair process. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 5, 2016. doi: 10.1101/cshperspect.a026070.

WISE, S. S.; HOLMES, A. L.; LIOU, L.; ADAM, R. M.; WISE, J. P. Hexavalent chromium induces chromosome instability in human urothelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 296, p. 54-60, 2016. doi: 10.1016/j.taap.2016.02.015.

YILDIZ, M. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934–938, 2009. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.023.

ZHANG, W.; FLEMINGTON, E. K.; ZHANG, K. Mutant TP53 disrupts age-related accumulation patterns of somatic mutations in multiple cancer types. **Cancer Genetics**, v. 209, n. 9, p. 376–380, 2016. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.07.001.

ŽIVKOVIĆ, L.; BAJIĆ, V.; BRUIĆ, M.; BOROZAN, S.; POPIĆ, K.; TOPALOVIĆ, D.; SANTIBANEZ, J.; SPREMO-POTPAREVIĆ, B. Antigenotoxic and antioxidant potential of medicinal mushrooms (Immune Assist) against DNA damage induced by free radicals-an in vitro study. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 845, 2019. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.06.008.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Artigo formatado conforme normas da revista *Environmental and Molecular Mutagenesis*

O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DE *Lactuca sativa*: AUMENTANDO A REPRODUTIBILIDADE E CONFIABILIDADE

Mateus William de Faria Eleutério^a, Silvana Marcussi^b, Larissa Fonseca Andrade-Vieira^a

^aUniversidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia/Laboratório de Citogenética

^bUniversidade Federal de Lavras, Departamento de Química/Laboratório de Bioquímica

O ensaio cometa é o teste mais comum para avaliação de quebras no DNA, com relevante contribuição para diferentes áreas, sobretudo, da toxicologia genética e da toxicologia ambiental. As quebras na molécula de DNA podem ser em suas simples e duplas fitas, pela ação de agentes físicos, químicos ou biológicos, produzindo efeitos aneugênicos e clastogênicos. Esse ensaio pode ser aplicado aos mais diferentes organismos, tecidos e tipos celulares, porém cada modelo empregado requer padronização, otimização e calibração de parâmetros metodológicos, utilizando indutores de danos conhecidos, para obtenção de resultados confiáveis. O modelo vegetal *Lactuca sativa* se mostra um bom modelo para aplicação do ensaio cometa, apresentando características como facilidade de obtenção, cultivo e rápido desenvolvimento inicial. Nesse contexto, o objetivo no presente trabalho foi aumentar a reprodutibilidade dos resultados obtidos e portanto a confiabilidade do ensaio cometa no modelo vegetal *Lactuca sativa*, por meio da otimização de parâmetros experimentais que permitam maior contagem de nucleóides amostrados, bem como formação adequada dos cometas durante a migração eletroforética, de modo que estes possam ser avaliados por software em método de escore semi automatizado, reduzindo o tempo de avaliação e obtenção dos resultados. As condições ideais encontradas se relacionam a quantidade de raízes para a contagem de 100 nucleóides/lâmina e 300 nucleóides/tratamento; tempo de maceração em tampão fosfato salino (PBS), sobre gelo e na ausência de luz; eficiência da etapa de lise celular; tempo de imersão em solução de eletroforese (alcalina) antes da corrida; tempo de corrida eletroforética e voltagem aplicada por centímetro durante a corrida (baseada na distância entre os polos da cuba de eletroforese). A calibração do ensaio foi realizada com três indutores de danos: metil metanossulfonato (MMS), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e formaldeído (CH₂O).

Os maiores níveis de fragmentação foram observados para o MMS e o peróxido de hidrogênio. A ampla divulgação dos dados obtidos, e a adesão de pesquisadores da área às condições experimentais, determinadas no presente trabalho, poderão influenciar positivamente a confiabilidade das pesquisas futuras utilizando o ensaio cometa no modelo vegetal *Lactuca sativa*, assim como facilitar as discussões de resultados obtidos por diferentes pesquisadores.

Palavras-chave: Ensaio cometa. *Lactuca sativa*. Fragmentação de DNA. Confiabilidade. Padronização.

1 Introdução

A versatilidade do ensaio cometa é demonstrada pelas suas mais diferentes aplicações. Desde sua origem em 1978 (RYDBERG; JOHANSON, 1978), diversas adaptações para finalidades específicas e otimizações da técnica foram feitas (GICHNER, 2003; PIPERAKIS, 2009; AZQUETA et al., 2011a; BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2011; DHAWAN; ANDERSON, 2016). Em diferentes campos de pesquisa, notadamente na toxicologia genética e na toxicologia ambiental, o ensaio cometa é a principal ferramenta para detecção de efeitos genotóxicos dos mais diferentes compostos e poluentes presentes no ambiente. A sua aplicação é possível para os mais variados organismos animais e vegetais, tecidos e tipos celulares (DHAWAN; ANDERSON, 2016). Ainda, o ensaio cometa é passível de ser aplicado em diferentes condições de pH, havendo duas versões da técnica: a neutra e alcalina. A primeira avalia predominantemente danos associados a dupla fita da molécula de DNA, enquanto que a segunda avalia diferentes danos e sítios álcali lábeis. Os cometas originados pelas duas técnicas, diferem, portanto, quanto ao mecanismo que são formados, havendo, assim, uma variação quanto a natureza dos danos causados por agentes genotóxicos (SHAPOSHNIKOV et al., 2008). Nesse contexto, é importante que uma padronização seja feita quando a técnica é aplicada em novas condições, sejam essas as descritas nos mais diferentes protocolos existentes ou a novos organismos e/ou modelos (AZQUETA et al., 2011a; COLLINS et al., 2014). Etapas como a obtenção da suspensão de núcleos, que inclui o tempo de picotagem das raízes

(POURRUT et al., 2015), o número de nucleóides obtidos e contados (KOPPEN et al., 2017), a concentração de agarose (AZQUETA et al., 2011a), a eficiência do uso da solução de lise (POURRUT et al., 2015; ENCISO et al., 2018), o tempo de imersão para desnaturação dos nucleóides e voltagem aplicada na etapa de eletroforese (AZQUETA et al., 2011a), bem como a calibração do protocolo usando indutores de danos conhecidos como o metil metanossulfonato (MMS) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (KOPPEN et al., 2017), e ainda o método de avaliação empregado (seja esse por escore visual, semi automatizado e automatizado) (AZQUETA et al., 2011b), são passos procedimentais no ensaio cometa essenciais para a obtenção de resultados confiáveis e reproduzíveis. Dada as diversas metodologias aplicadas por diferentes grupos de pesquisa, a variação entre laboratórios é um problema, inclusive com estudos publicados concernentes a essa discussão (GARCIA et al., 2004; AZQUETA et al., 2011a; COLLINS et al., 2014). A variabilidade existente entre experimentos executados no mesmo laboratório ou entre laboratórios (laboratórios diferentes avaliando as mesmas amostras) é, portanto, uma questão importante que deve ser avaliada a fim de reduzir as variações na obtenção e análise dos resultados (COLLINS et al., 2014)

O modelo vegetal *Lactuca sativa* é aplicado em muitos estudos e se mostra um bom modelo para análises de ciclo celular, alterações cromossômicas e nucleares, genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade (REIS et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017; ALVES et al., 2018; CARVALHO et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2019; ALVARENGA et al., 2020), e possui características comuns as encontradas em bons modelos experimentais: condições fáceis de cultivo, fácil obtenção das sementes e rápido crescimento (CHANG; BOWMAN; MEYEROWITZ, 2016). Portanto, a adaptação desse modelo vegetal ao ensaio cometa tem se mostrado bem aceita e de fácil aplicação, obtendo-se resultados confiáveis (REIS et al., 2017; SILVEIRA et al., 2017; ALVES et al., 2018). Sua aplicação têm sido descrita em estudos de índice mitótico, crescimento a partir de dados morfométricos (como comprimento de raízes) e

mesmo avaliação da organização da cromatina através de estudos citogenéticos (fosforilação da histona H3), em resposta ao poluente ambiental SPL (FREITAS et al., 2016).

Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi a otimização do ensaio cometa no modelo vegetal *Lactuca sativa* aumentando a quantidade de nucleóides contados, melhorando a morfologia dos cometas para avaliação semi automatizada, objetivando a redução do tempo de avaliação dos resultados, sem a perda da confiabilidade, além de avaliar dentro das padronizações experimentais, os agentes indutores de danos amplamente empregados no ensaio cometa e em demais testes de (cito)genotoxicidade, sendo esses Metil Metanosulfonato (MMS), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Formaldeído (CH_2O).

2 Material e Métodos

2.1 Otimização do teste do cometa para o modelo vegetal *Lactuca sativa*

Objetivando-se obter resultados mais robustos e em menor tempo, foram determinadas condições experimentais a serem ensaiadas, com base em alguns protocolos descritos em literatura, que utilizam parâmetros comuns e empregados na maioria das técnicas do teste do cometa em plantas. Como controle negativo, foi utilizado na padronização, água ultrapura (controle negativo) e como controles positivos, os seguintes compostos: metil metanossulfonato (MMS) 150 μ M, peróxido de hidrogênio (200 μ M) e formaldeído (10 μ M). Foi também avaliada a influência da variação de alguns parâmetros sobre a robustez dos resultados a serem obtidos: 1) Quantidade de material vegetal, raízes, para se obter a contagem mínima de 100 nucleóides/lâmina e 300 nucleóides/tratamento; 2) Tempo de maceração das raízes para obtenção da suspensão de núcleos; 3) Execução ou não da etapa de lise celular; 4) Tempo de imersão em solução de eletroforese (alcalina) e 5) Voltagem aplicada durante a corrida eletroforética. Experimentos foram realizados na ausência de luz e a temperatura controlada (inferior a 21°C) (AZQUETA et al., 2011a; COLLINS et al., 2014; LANIER et al., 2015; POURRUT et al., 2015).

2.2 Quantidade de raízes

As sementes (número de raízes 10, 15, 20 e 25) de *Lactuca sativa*, variedade Grande Lagos, foram depositadas em placas de Petri, envoltas em papel alumínio e sobre papel filtro embebido em água ultrapura, foram postas para germinar no escuro em incubadora BOD a 24°C. Após 16 horas, as raízes emergiram (1-4 mm de comprimento). Sendo excisadas após 24 horas de exposição, colocadas em placas de Petri sobre gelo em 300 µL de tampão fosfato salino (PBS) gelado e picotadas com lâmina de barbear nova (JOVTCHEV; MENKE; SCHUBERT, 2001). Em seguida, todas as alíquotas de suspensão de núcleos foram filtradas em CellTrics (Partec®) (filtros de nylon de 50 µm) acoplados a microtubos, envoltos em dupla folha de papel alumínio, e em seguida, mais 300 µL de tampão PBS foram adicionados. Os microtubos, contendo as suspensões de núcleos foram mantidos em gelo até o momento de uso.

2.3 Tempo de maceração das raízes de *Lactuca sativa* para obtenção da suspensão de núcleos

Após determinada a quantidade mínima de raízes para que ao menos 100 nucleóides pudessem ser contados por lâmina, três lâminas por amostra, as sementes de *Lactuca sativa*, variedade Grande Lagos, foram postas para germinar e crescer nas mesmas condições descritas acima. Para a obtenção da suspensão de núcleos foram testados diferentes tempos de maceração das raízes: 2, 2,5, 4,5, 6,5 e 8,5 minutos (POURRUT et al., 2015) nas mesmas condições dos experimentos previamente descritos.

2.4 Etapa de lise celular

Uma vez determinados a quantidade mínima de raízes a serem utilizadas e o tempo para a maceração dessas, estes parâmetros otimizados foram reproduzidos em novo ensaio para avaliação da etapa de lise.

Para tanto, metade das 6 lâminas obtidas para esta etapa foram submetidas a solução de lise (2.5 M NaCl, 1% sarcosinato de sódio, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10, 4°C) por 2 h (GICHNER et al., 1999).

2.5 Desnaturação dos nucleóides

Considerando as condições otimizadas nos itens anteriores, todo o processo foi repetido para a padronização da próxima etapa. Foram então adicionados à suspensão de nucleóides 500 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 40°C. A mistura obtida foi pipetada em lâminas pré-revestidas com gel de agarose de ponto de fusão normal (NMP), a 1,0%. As soluções de agarose foram preparadas em água ultrapura e a solubilização foi feita em banho com fervura ao invés de micro-ondas. As amostras foram aplicadas nas lâminas e imediatamente cobertas com lamínulas e levadas para geladeira (4°C), onde permaneceram por 30 minutos.

As lamínulas foram então, retiradas, e as lâminas divididas em três recipientes e colocadas imersas em solução altamente alcalina (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13), a 4°C, para desnaturação dos nucleóides. Foram também testados três tempos de desnaturação dos nucleóides (exposição dos sítios álcali lábeis): 10, 20 e 30 minutos (AZQUETA et al., 2011a).

2.6 Voltagem

A voltagem aplicada durante a corrida eletroforética foi avaliada também. Portanto, os procedimentos experimentais relatados previamente foram repetidos e as lâminas foram submetidas a corrida eletroforética onde três voltagens diferentes foram testadas: 0,5 V/cm, 1,0

V/cm e 1,5 V/cm (AZQUETA et al., 2011a). Os valores foram calculados a partir da distância entre os polos da cuba usada nos experimentos (dimensões 40 x 25 x 12 cm) (BRUNBORG; ROLSTADAAS; GUTZKOW, 2016), possibilitando a programação das diferentes voltagens (20, 40 e 60 volts), por 30 minutos de corrida.

2.7 Teste do cometa no modelo vegetal *Lactuca sativa* com aplicação de controles

As 20 sementes já germinadas, após 16 horas e com radículas com 1-4 mm de comprimento, foram tratadas por 24h com cada um dos tratamentos: Como controles foram utilizados na padronização água ultrapura, a mesma usada para diluição dos tratamentos (controles), metil metanossulfonato - MMS (150 μ M), peróxido de hidrogênio (200 μ M) e formaldeído (10 μ M). As sementes permaneceram em crescimento por 24 horas, sendo então excisadas e colocadas em placas de Petri sobre gelo em 300 μ L de tampão fosfato salino gelado (PBS) e picotadas com lâmina de barbear nova para isolamento dos núcleos. As suspensões de núcleos obtidas para cada tratamento foram filtradas em filtros CellTrics (Partec®) de 50 μ m em microtubos envoltos em papel alumínio, folha dupla. Sendo adicionados mais 300 μ L de tampão PBS. Obtendo-se, a suspensão para a realização do ensaio cometa. Foram adicionados à suspensão de núcleos 500 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 1,0 % a 40°C. A mistura obtida foi pipetada em lâminas pré-revestidas com gel de agarose de ponto de fusão normal (NMP) 1,0%. As soluções de agarose foram preparadas em água ultrapura e a solubilização foi feita em banho com fervura ao invés de micro-ondas. Cada amostra foi espalhada nas lâminas e estas foram cobertas com lamínulas e levadas para geladeira (4°C), onde permaneceram por 30 minutos. Em seguida, os núcleos foram desnaturados em solução altamente alcalina (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13) durante 30 min à 4°C. As lâminas foram então, colocadas em cuba de eletroforese horizontal com tampão de corrida gelado (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13) a 1 V/cm (40 V) durante 30 min (GICHNER et al., 2009;

AZQUETA et al., 2011a; BARAGAMAARACHCHI et al., 2015). Após a corrida eletroforética, as lâminas permaneceram por 15 minutos em solução de neutralização (0.4M Tris-HCl, pH 7.4). Todas as etapas foram realizadas com ausência de luz e em temperatura controlada (não excedendo 21°C) (POURRUT et al., 2015). Finalmente, as lâminas foram desidratadas em álcool 96% durante 5 minutos e secas durante 1 hora à temperatura ambiente, coradas com iodeto de propídeo (PI) ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$ em água) e cobertas com lamínula. Foram avaliados 100 nucleóides escolhidos aleatoriamente por lâmina/replicata sob objetiva de 40x em microscópio de epifluorescência. Os cometas (nucleóides) foram categorizados por escores de 0 a 4. A classificação dos níveis de danos foi realizada por metodologia semi automatizada (AZQUETA et al., 2011b), com seleção de imagens por um usuário e classificação dos níveis de danos, em função da porcentagem de DNA na cabeça dos cometas pelo software CometScore (TriTec, EUA). No total, 300 núcleos por tratamento foram analisados (LANIER et al., 2015). Os escores obtidos foram representados em valores de Unidades Arbitrárias (UA) (Collins, 2004) e porcentagem de cometas com dano. As UAs, são obtidas pela seguinte fórmula: A média do número de nucleóides em cada classe (N0, N1, N2, N3 e N4) x Pesos de cada classe (0 a 4). $(0*N0)+(1*N1)+(2*N2)+(3*N3)+(4*N4)$. As UAs variam, portanto, de 0-400. A porcentagem de danos leva em conta a soma das médias de todos os nucleóides com danos (apenas a classe 0 não é considerada na soma).

2.8 Análise dos dados

Foi feita estatística descritiva dos dados em que esses foram representados por suas médias e desvios (SD) em tabelas e gráficos. Foi utilizado para tanto o software Microsoft Office Excel 2016[®].

3 Resultados

3.1 Quantidade de raízes

Esta etapa foi conduzida com o objetivo de verificar a quantidade adequada de material vegetal (raízes) de *Lactuca sativa*, necessária para que se houvesse uma contagem mínima de 100 nucleóides por lâmina (300 nucleóides por tratamento). A tabela 1 reúne os dados obtidos, havendo uma tendência para o aumento do número de nucleóides proporcional ao aumento da quantidade de raízes maceradas. A figura 1 representa a variação das unidades arbitrárias (UA), porcentagem de nucleóides com danos e número de nucleóides obtidos na contagem em cada uma das quantidades de raízes avaliadas. As quantidades de raízes mais favoráveis foram 15 e 20 raízes por tratamento. Obtendo-se médias de nucleóides por lâmina de $116,33 \pm 1,53$ para 15 raízes e $151,67 \pm 0,58$ para 20 raízes.

Tabela 1. Nucleóides obtidos por quantidade de raízes de *Lactuca sativa* maceradas.

Quantidade de raízes	Nucleóides por classe de cometa (%)					Unidades Arbitrárias	% Nucleóides com danos	Nº Nucleóides
	0	1	2	3	4			
10	55,13 ±1,28	38,89 ±0,74	4,27 ±0,74	0,85±0,74	0,85±0,74	53,42	44,87	78,00 ±2,65
15	44,99 ±0,50	44,41±1,31	7,16 ±0,99	3,15 ±0,50	0,29 ±0,50	69,34	55,01	116,33 ±1,53
20	45,49 ±0,66	45,49 ±0,66	5,93 ±0,66	2,20 ±0,38	0,88 ±0,38	67,47	54,51	151,67 ±0,58
25	56,62 ±0,71	36,25 ±0,35	4,28 ±0,61	2,65 ±0,35	0,20 ±0,35	53,56	43,38	163,67 ±3,06

Os dados estão representados pela média e SD. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados.

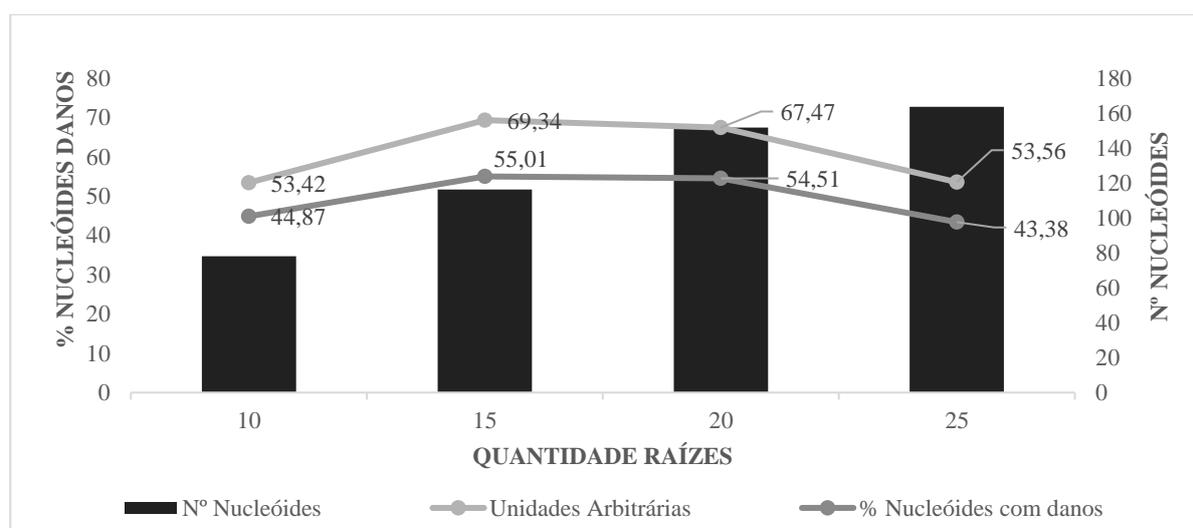


Figura 1. Número de nucleóides obtidos por quantidade de raízes de *Lactuca sativa* maceradas, versus Unidades Arbitrárias e porcentagem de nucleóides com danos. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a

soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados.

3.2 Tempo de maceração das raízes de *Lactuca sativa* para obtenção da suspensão de núcleos

Os melhores tempos de maceração ficaram, entre 2 e 2,5 minutos em função da quantidade de nucleóides obtidos e dos danos causados pela extração mecânica dos núcleos por meio de sua picotagem com lâmina de barbear. Para o tempo de 2 minutos foi obtido um valor de 59,23 para as unidades arbitrárias e uma porcentagem de nucleóides com danos de 48,93. O valor de UA no tempo de 2,5 minutos foi de 66,51, sendo observados 49,69% de nucleóides com danos. A figura 2 mostra a variação dos danos em relação ao número de nucleóides obtidos em cada tempo.

Tabela 2. Nucleóides obtidos por tempo de maceração.

Maceração (min)	Nucleóides por classe de cometa (%)					Unidades Arbitrárias	% Nucleóides com danos	Nº Nucleóides
	0	1	2	3	4			
2,00	51,07 ±0,74	41,20 ±0,78	5,15 ±0,78	2,58 ±0,78	0,00 ±0,00	59,23	48,93	77,67 ±0,58
2,50	45,97 ±0,78	40,78 ±0,45	8,57 ±0,78	4,16 ±0,45	0,52 ±0,45	66,51	49,69	128,33 ±1,15
4,50	51,31 ±0,71	35,63 ±0,71	9,26 ±0,71	2,85 ±0,71	0,95 ±0,41	72,47	54,03	140,33 ±3,21
6,50	39,55 ±0,28	47,33 ±0,28	8,75 ±0,49	2,92 ±0,49	1,46 ±0,49	73,11	55,56	205,67 ±2,08
8,50	44,44 ±0,40	45,11 ±0,23	6,75 ±0,40	3,31 ±0,23	0,40 ±0,40	79,42	60,45	252,00 ±1,00

Os dados estão representados pela média e SD. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados.

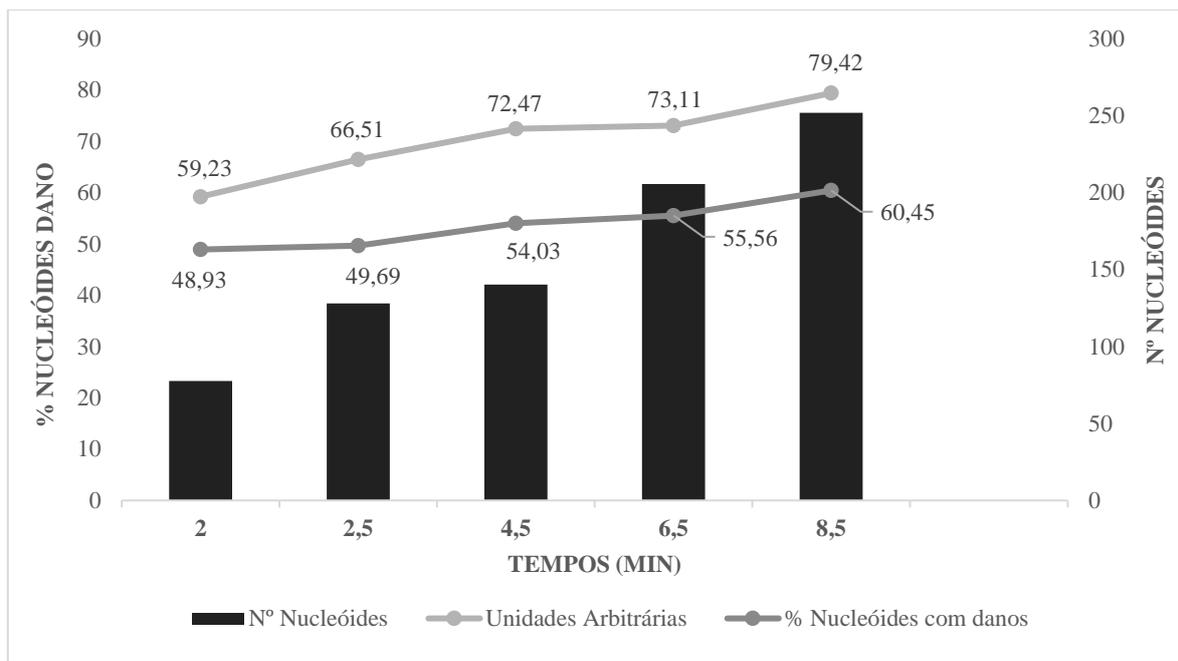


Figura 2. Número de nucleóides obtidos por tempo de maceração, versus unidades arbitrárias e porcentagem de nucleóides com danos. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados.

3.3 Etapa de lise celular

No ensaio em que a lise foi incluída o valor de UA foi de 92,50, a porcentagem de cometas com danos foi de 62,81% e a média do número de nucleóides obtidos por lâmina foi de $106,67 \pm 4,04$. Sem a etapa de lise o valor de UA observado foi 41,78, a porcentagem de cometas com danos foi de 36,62 e média do número de nucleóides por lâmina foi de $71,00 \pm 4,58$ (tabela 3). A figura 3 apresenta a variação desses valores, relacionando-as.

Tabela 3. Nucleóides obtidos no ensaio cometa realizado com e sem etapa de lise celular.

Etapa de Lise	Nucleóides por classe de cometa (%)					Unidades Arbitrárias	% Nucleóides com danos	Nº Nucleóides
	0	1	2	3	4			
Com lise	$37,19 \pm 1,43$	$41,88 \pm 1,43$	$13,13 \pm 1,88$	$6,88 \pm 1,43$	$0,94 \pm 0,94$	92,50	62,81	$106,67 \pm 4,04$
Sem lise	$63,38 \pm 4,23$	$32,86 \pm 1,63$	$2,35 \pm 0,81$	$1,41 \pm 1,41$	$0,00 \pm 0,00$	41,78	36,62	$71,00 \pm 4,58$

Os dados estão representados pela média e SD. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados, para ensaios realizados com e sem a etapa de lise celular.

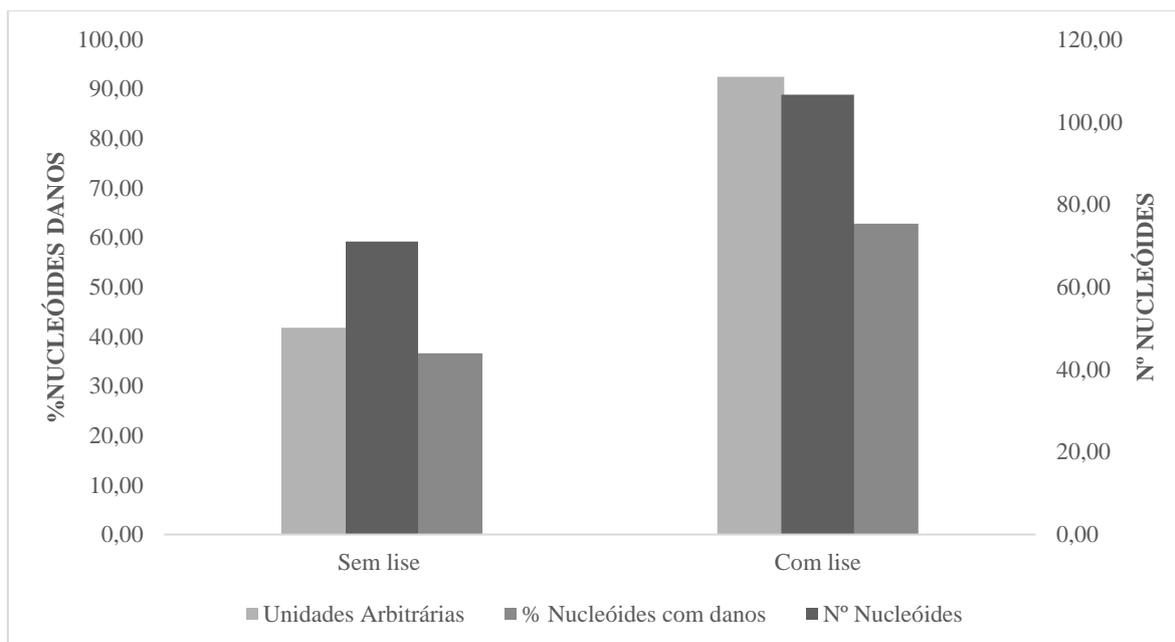


Figura 3. Número de nucleóides obtidos em cometas realizados com e sem a etapa de lise celular, versus unidades arbitrárias e porcentagem de nucleóides com danos. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados, para ensaios realizados com e sem a etapa de lise celular.

3.4 Desnaturação dos nucleóides

A desnaturação foi avaliada após permanência das lâminas contendo os nucleóides, em diferentes tempos, imersas em solução de desnaturação altamente alcalina, $\text{pH} > 13$. Nos tempos testados 10, 20 e 30 minutos, as UA observadas foram 51,00, 73,33 e 77,00, respectivamente. As porcentagens de nucleóides com danos foram de 46,67 para o tempo 10 minutos de imersão, 55,67 para 20 minutos e 61,33 para 30 minutos (tabela 4). A figura 4 apresenta a relação entre os valores de danos (UA e porcentagem nucleóides com danos), e o tempo de imersão dos nucleóides na solução de desnaturação. Durante a observação dos nucleóides foi observada maior descompactação da cromatina (DNA + proteínas) concomitante ao aumento no tempo de exposição à solução alcalina.

Tabela 4. Nucleóides obtidos nos diferentes tempos de desnaturação.

Tempo de imersão (min)	Nucleóides por classe de cometa (%)					Unidades Arbitrárias	% Nucleóides com danos
	0	1	2	3	4		
10	53,33 ±2,00	29,67 ±1,15	10,67 ±1,53	6,67 ±1,15	0,00 ±0,00	51,00	46,67
20	43,33 ±1,53	43,67 ±2,08	10,00 ±1,00	2,33 ±0,58	0,67 ±0,58	73,33	55,67
30	38,67±1,53	49,67±2,08	8,33±0,58	2,67 ±0,58	0,67 ±0,58	77,00	61,33

Os dados estão representados pela média e SD. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados, para ensaios realizados com diferentes tempos de imersão em solução alcalina, pH > 13.

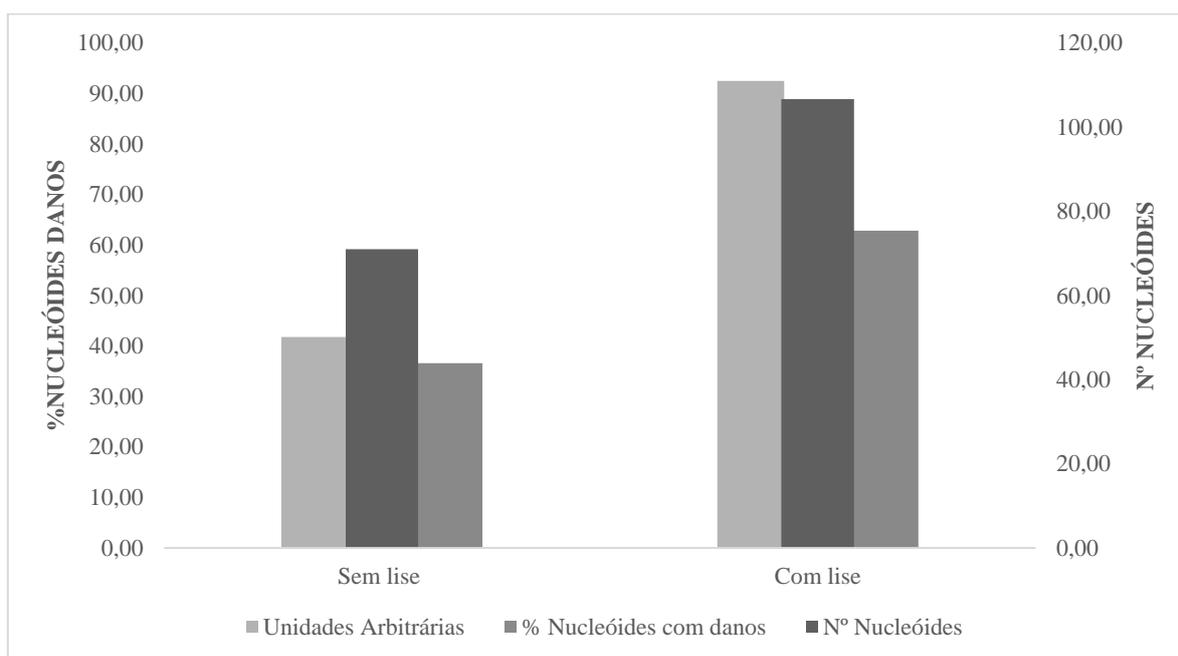


Figura 4. Número de nucleóides obtidos em cometas realizados com diferentes tempos de imersão em solução desnaturante, versus unidades arbitrárias e porcentagem de nucleóides com danos. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados, para ensaios realizados com diferentes tempos de imersão.

3.5 Voltagem

A influência da voltagem aplicada durante a corrida eletroforética foi também avaliada.

Na etapa de migração de moléculas de DNA íntegras e seus fragmentos, ao longo do gel, observou-se um aumento na migração concomitante ao aumento da voltagem por centímetro de distância entre os polos da cuba de eletroforese (Figura 5). Desta forma, as voltagens 1,0 e 1,5 V/cm mostraram-se mais adequadas.

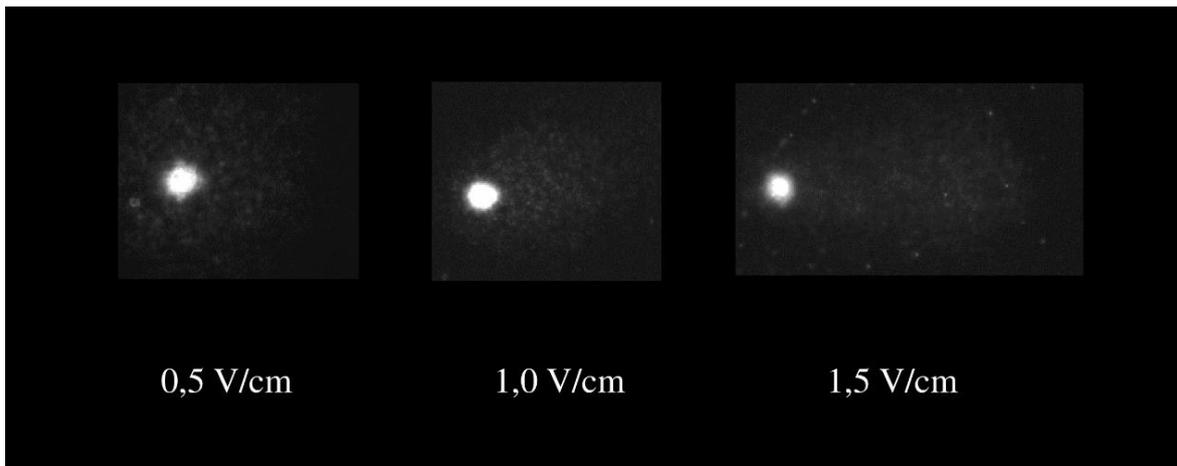


Figura 5. Nucleóides submetidos a corrida eletroforética em três voltagens diferentes.

3.6 Validação dos parâmetros previamente determinados para o ensaio cometa no modelo vegetal *Lactuca sativa* e calibração dos controles

Uma vez definidas as quantidades de raízes a serem usadas no ensaio, tempo de maceração dos meristemas para obtenção da suspensão de núcleos, etapa envolvendo a solução de lise, tempo de desnaturação dos nucleóides na solução altamente alcalina e a voltagem por centímetro de distância entre os polos da cuba, foi então realizado, empregando-se as condições mais favoráveis encontradas, o ensaio cometa utilizando três indutores de danos (metanossulfonato, MMS; formaldeído, CH_2O ; peróxido de hidrogênio, H_2O_2), definidos com base na literatura. Os controles foram comparados com o controle negativo, correspondente a água ultrapura, a mesma usada para a diluição dos tratamentos. No controle negativo foram obtidos valores de 35,51 e 27,10 para UA e porcentagem de cometas com danos, respectivamente. Para o tratamento com 150 μM de metil metanossulfonato, os valores de UA e porcentagem de cometas com dano foram de 85,52 e 63,83, respectivamente. No tratamento com 10 μM de formaldeído o valor das UA foi de 61,33 e a porcentagem de cometas com danos foi 48,00. No terceiro tratamento em que 200 μM de peróxido de hidrogênio foram utilizados, os valores de UA e porcentagem de cometas com danos foram de 65,78 e 47,56, respectivamente

(tabela 5). A figura 6 mostra a variação das UA e porcentagem de cometas com danos em comparação com o controle realizado com água ultrapura.

Tabela 5. Nucleóides obtidos nos tratamentos com os indutores de danos metil metanossulfonato, peróxido de hidrogênio e formaldeído.

Tratamentos (μM)	Nucleóides por classe de cometa (%)					Unidades Arbitrárias	% Nucleóides com danos
	0	1	2	3	4		
Controle	72,90 \pm 5,61	21,50 \pm 4,28	2,80 \pm 2,80	2,80 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	35,51	27,10
MMS 150	36,17 \pm 0,99	50,17 \pm 0,66	9,30 \pm 0,66	3,65 \pm 0,70	0,52 \pm 0,66	82,52	63,83
CH ₂ O 10	52,00 \pm 4,62	39,11 \pm 5,39	4,89 \pm 2,04	3,56 \pm 0,77	0,44 \pm 0,77	61,33	48,00
H ₂ O ₂ 200	52,44 \pm 5,55	52,44 \pm 4,68	5,33 \pm 3,53	0,89 \pm 0,00	0,77 \pm 0,00	65,78	47,56

MMS: Metil metanossulfonato. CH₂O: Formaldeído. H₂O₂: Peróxido de hidrogênio. Controle: água ultrapura. Os dados estão representados pela média e SD. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados, para ensaios realizados com os diferentes tratamentos.

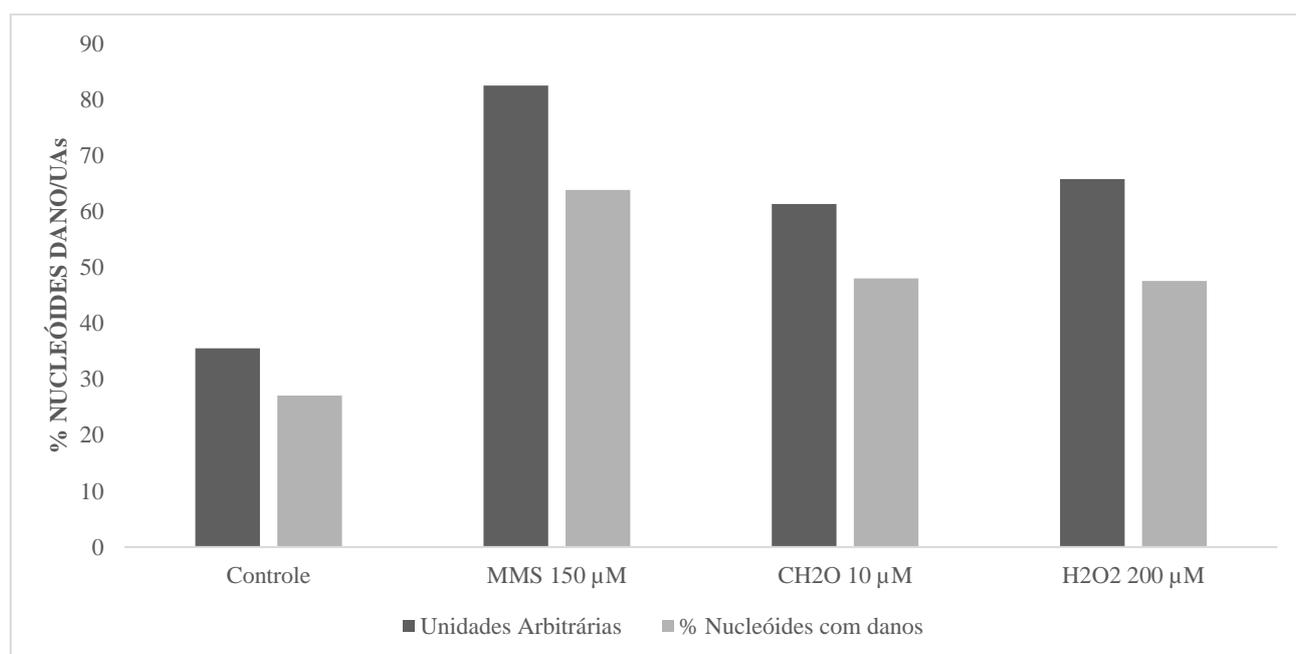


Figura 6. Número de nucleóides obtidos em cometas realizados com diferentes tratamentos, versus unidades arbitrárias e porcentagem de nucleóides com danos. Valores de unidades arbitrárias (UA) foram calculados conforme descrito por Collins (2004). A porcentagem de nucleóides com danos corresponde a soma das médias de todos os nucleóides classificados de 1 a 4. O número de nucleóides corresponde à média de três lâminas, nas quais todos os nucleóides existentes foram contados, para cada tratamento. MMS: Metil metanossulfonato. CH₂O: Formaldeído. H₂O₂: Peróxido de hidrogênio. Controle: água ultrapura.

4 Discussão

O número de cometas contados por tratamento e por indivíduos/plantas/animais reportado na literatura é, de maneira geral, variável. O mais comum é a contagem de 300

nucleóides/tratamento (100 nucleóides por lâmina/3 lâminas). Relativo aos protocolos que empregam modelos vegetais esse número varia de 75 a 300 nucleóides/tratamentos. A maioria dos estudos utilizam de 75 a 150 nucleóides como amostragem para classificação e quantificação de danos no DNA (LANIER et al., 2015; POURRUT et al., 2015; KOPPEN et al., 2017). Há recomendação, de que esse número seja de pelo menos 100 tratamento/indivíduos/planta/animal (KOPPEN et al., 2017). Contudo, em função da necessidade de uma amostragem mais confiável e para evitar algum viés relacionado ao grau de confiabilidade da metodologia utilizada para obtenção dos nucleóides, é recomendada uma contagem mínima de 300 nucleóides/tratamento, sendo, ainda, reportada a quantidade de 600 nucleóides/tratamento na literatura (LANIER et al., 2015). Diante disso, no presente estudo, a amostragem observada foi baseada em 300 nucleóides/por tratamento, tal contagem foi obtida utilizando a quantidade de 20 raízes. A quantidade de material vegetal utilizada é outro fator que varia muito entre os trabalhos encontrados na literatura. Essa quantidade, a ser utilizada para isolamento e obtenção da suspensão de núcleos, está diretamente relacionada com o número de nucleóides obtidos conforme resultados mostrados (figura 1). Pourrut e colaboradores (2015), objetivando propor recomendações para aumentar a confiabilidade do ensaio cometa utilizaram 150 mg de material vegetal, de diferentes espécies de modelos vegetais, dentre eles *Nicotiana tabacum* e *Allium cepa*. Contudo, no presente estudo, obter esta quantidade de material se mostrou inviável uma vez que o número de raízes (obtidas via crescimento e exposição indireta em placas de Petri) necessárias para se atingir essa amostragem aumentou excessivamente o tempo de realização do ensaio e 20 raízes do modelo vegetal utilizado propiciou quantidade adequada de células para amostragem conforme demonstrado na figura 1.

A parede celular presente nas células vegetais é um elemento que dificulta o isolamento dos núcleos. A maceração para obtenção da suspensão de núcleos é outra variável em que não

há consenso quanto ao método utilizado. Alguns protocolos utilizam picotagem do material vegetal "gentilmente", com objetivo de evitar danos mecânicos ao DNA, ou por ação de enzimas, método que se mostra mais demorado e subjetivo. O recomendado é o uso de lâminas de barbear novas para destruição da parede celular e correto isolamento dos núcleos (GICHNER, 2003; LIMAN, 2013; DHAWAN; ANDERSON, 2016). Contudo, o tempo de maceração dos tecidos vegetais influencia nos resultados, aumentando proporcionalmente os danos observados nos nucleóides em função do tempo (quanto maior o tempo de maceração dos tecidos vegetais maior os danos observados). A temperatura e a luminosidade são variáveis que também influenciam os resultados obtidos no ensaio, sendo necessário evitar altas temperaturas e exposição a luz durante o isolamento dos núcleos e demais etapas procedimentais (POURRUT et al., 2015). Nesse sentido, optou-se por padronizar a intensidade e o tempo de picotagem das raízes utilizadas, buscando a determinação de níveis basais de danos resultantes do método de obtenção da suspensão de núcleos, e possibilitando a redução de viés na avaliação do potencial genotóxico em pesquisas futuras. Outro cuidado relevante, que deve ser tomado antes e durante a obtenção da suspensão de núcleos, é a execução dos procedimentos sobre gelo e a utilização imediata das soluções, assim que retiradas da geladeira (GICHNER, 2003). Foi observado (figura 2) que a medida que o tempo de picotagem das raízes é aumentado, a quantidade de nucleóides obtidos também aumenta. Embora não seja indicado um tempo muito elevado, pois ocorrerá concomitantemente um aumento nos danos mecânicos causados nas moléculas de DNA, resultando em fragmentações superestimadas. Assim, foi selecionado o tempo de 2 minutos de maceração dos tecidos vegetais (raízes) para obtenção da suspensão de núcleos, levando em consideração: maior número de nucleóides contados, menor nível de danos causados pelo método de isolamento dos nucleóides e em menor tempo (figura 2). O tempo de 30s, utilizando a quantidade de 150 mg, sugerido em outro estudo não se mostrou eficiente nas condições testadas, devido às dificuldades em obter essa quantidade de

material por sementes germinadas em placas de Petri, bem como o aumento significativo no tempo de execução do ensaio. Os pesquisadores do estudo citado acima trabalharam com as espécies vegetais *Lolium perene*, *Trifolium repens*, *Miscanthus x giganteus* e *Vicia faba* (POURRUT et al., 2015).

No ensaio cometa em células animais, a etapa de lise tem por função romper as membranas e promover o isolamento dos nucleóides. No entanto, para o ensaio cometa aplicado a modelos vegetais, a tendência é que esta etapa não seja incluída (LANIER et al., 2015), uma vez que não se mostra tão efetiva quanto para células animais, sendo inclusive associada ao aumento de danos no DNA (POURRUT et al., 2015). Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a indução de maiores níveis de danos (UA e porcentagem de cometas com danos) quando o cometa é acrescido da etapa de lise celular (tabela 3, figura 3), embora também seja observado um maior número de nucleóides no ensaio com lise celular. Nesse caso, a maior quantidade de nucleóides obtida não justifica a perda de confiabilidade na avaliação de tratamentos, visto que os controles apresentam altos níveis de danos.

A imersão das lâminas com nucleóides, antes da eletroforese, em solução de desnaturação altamente alcalina ($\text{pH} > 13$) é considerada uma etapa importante, quando se trata do ensaio cometa alcalino, o mais usado desde que foi inicialmente proposto (SINGH et al., 1988; LANIER et al., 2015; KOPPEN et al., 2017). Alguns trabalhos descrevem a necessidade de um tempo mínimo de permanência em solução desnaturante de 30 minutos (AZQUETA et al., 2011a; BARAGAMAARACHCHI et al., 2015), sendo observado, assim como em nosso trabalho, uma maior exposição dos sítios alcali lábeis e portanto a formação de cometas com morfologia adequada, facilitando a classificação dos níveis de danos, após a corrida eletroforética.

O afrouxamento proporcionado por esta etapa permite que moléculas de DNA superenoveladas, após o isolamento dos nucleóides, se tornem passíveis de migração, uma vez que se inicia a diferença de potencial elétrico aplicada na etapa de eletroforese (figura 5).

A forma como os cometas são formados ainda não é bem entendida. O DNA presente na cabeça e cauda dos cometas é dupla fita no ensaio cometa em condições neutras enquanto que em condições alcalinas o DNA presente na cabeça é dupla fita e na calda simples fita, fragmentada (SHAPOSHNIKOV et al., 2008). A diferença de potencial aplicada durante a corrida eletroforética é outro fator que influencia na forma dos cometas, uma vez que os fragmentos de DNA migrarão por uma distância maior ou menor de acordo com a voltagem aplicada e o tempo de corrida. Azqueta e colaboradores (2011a), sugerem uma voltagem de 1,15 V/cm por 30 minutos como condições para a etapa de eletroforese, sendo observado em nosso trabalho, após avaliação do ensaio nas voltagens 0,5 V/cm, 1,0 V/cm e 1,5 V/cm, que os melhores resultados são obtidos em 1,0 V/cm e 1,5 V/cm (figura 5). São observadas variações na corrente elétrica, em diferentes regiões dentro da cuba, destacando assim, a importância de se empregar uma diferença de potencial que seja eficiente para que a corrida eletroforética proporcione a correta formação dos cometas em todas as lâminas de uma mesma corrida (BRUNBORG; ROLSTADAAS; GUTZKOW, 2016).

Em conclusão, faz-se necessária a padronização das etapas mencionadas anteriormente, com o objetivo de definir condições ótimas para a execução do ensaio cometa, onde resultados confiáveis e reprodutíveis possam ser obtidos (AZQUETA et al., 2011a).

A calibração do ensaio do cometa pode ser feita com indutores de danos conhecidos (KOPPEN et al., 2017), como o metil metanossulfonato (MMS), um agente alquilante de DNA (LEE et al., 2007), ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂) capaz de produzir danos por estresse oxidativo (geração de radicais livres capazes de causar quebras nas fitas simples e duplas do DNA) (AHSAN; ALI; ALI, 2003). O formaldeído (CH₂O), também tem sido empregado como

controle para a indução de danos no ensaio cometa, sendo capaz de formar ligações cruzadas, originando adutos covalentes de DNA (MA; HARRIS, 1988; MERK; SPEIT, 1999; LI et al., 2004; KAWANISHI; MATSUDA; YAGI, 2014), com ação genotóxica e clastogênica (MA et al., 1995; CABUGA JR et al., 2017).

No presente estudo, o MMS foi responsável pelos maiores danos observados, seguido pelo H_2O_2 e CH_2O , quando comparados ao controle realizado com água ultrapura, sendo estes condizentes com o que é reportado na literatura. Agentes capazes de produzir maiores danos no DNA, promovem um aumento na migração dos fragmentos que forma a cauda dos cometas, contudo, o CH_2O atua na formação de ligações cruzadas do tipo DNA-DNA e DNA-proteína, responsável por reduzir a migração dos fragmentos, o que pode explicar os menores níveis de danos observados (MERK; SPEIT, 1999; PIPERAKIS, 2009).

Entretanto, a facilidade de obtenção do CH_2O , o torna uma boa opção de controle positivo para o ensaio cometa, visto que, drogas antitumorais, como cisplatina, Doxorubicina e mesmo o MMS, embora utilizados frequentemente como controles para indução dos danos, podem ter seu uso dificultado em função do alto custo e dificuldade de obtenção. Na literatura, não há consenso para os valores de danos observados no controle, realizado para o ensaio cometa em modelos vegetais. Neste sentido, é importante levar em conta que a quantidade de danos observados no controle, é variável, conforme a metodologia empregada (PALMIERI et al., 2016, 2019; SILVEIRA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2019; ALVARENGA et al., 2020). Ademais, o controle negativo, não representa a ausência de danos (KOPPEN et al., 2017), mas sim níveis basais ou aceitáveis de danos para o tipo celular avaliado, considerando a existência de danos, oriundos de fontes endógenas, como o próprio metabolismo celular.

Em relação a metodologia de classificação de danos, foi utilizada a semiautomatizada, onde um software (CometScore TriTec, EUA) foi empregado para análise dos nucleóides (classificação de danos), após seleção e captura das imagens pelo usuário, baseando-se na

porcentagem de DNA na cabeça dos cometas. O software é capaz de gerar outros valores de classificação de danos, como porcentagem de danos na cauda, momento de cauda, etc. Assim, são requeridas imagens de lâminas com boa qualidade para que a quantificação dos danos não seja subestimada ou superestimada.

Utilizando a metodologia de escore visual, a diferenciação entre classes de cometas muito próximas, como entre 0 e 1, ou entre 2 e 3, caracteriza dificuldades em padronizar a precisão da avaliação por diferentes observadores e em diferentes condições, tais como números volumosos de tratamentos e nucleóides a serem avaliados e a fotossensibilidade do observador (AZQUETA et al., 2011b). No método completamente automatizado, artefatos presentes nas lâminas e nucleóides com morfologia inadequada podem ser incluídos nas análises, caracterizando uma margem de erro aos resultados obtidos. Desta forma, nas condições testadas neste estudo, foi observado que o método semiautomatizado tende a ser mais confiável. Devido a seleção prévia de imagens com nucleóides, que em seguida são analisados e classificados de forma automatizada, com uso do software. Sobretudo, nenhum dos métodos é inteiramente isento de algum erro, por exemplo, enquanto o método por escore visual tende superestimar danos em menores níveis, o método automatizado tende a perder danos elevados, não classificando-os (COLLINS et al., 2014).

5 Conclusão

Apesar de o ensaio cometa ser um dos testes mais utilizados para avaliação de efeitos genotóxicos das mais diversas substâncias, a variabilidade presente no ensaio é um viés que deve ser explorado, buscando reduzir deficiências durante a execução de protocolos, sobretudo na padronização em outras condições que não aquelas descritas em protocolos pré-determinados. Neste estudo, alguns desses parâmetros puderam ser redefinidos.

Resumidamente, as condições ótimas encontradas para o ensaio cometa aplicadas ao modelo vegetal *Lactuca sativa* foram: Quantidade de raízes preferencialmente 20, possibilitando a contagem mínima, com segurança, de 100 nucleóides/triplicata e 300 nucleóides/tratamento. O tempo de maceração de até 2,5 minutos, considerando menor tempo, obtenção de número adequado de nucleóides e menores danos físicos causados ao DNA durante a extração da suspensão de núcleos. Nessas condições, cabe mencionar que a utilização de tampão fosfato salino (PBS) gelado e a picotagem das raízes em placa de Petri sobre gelo e sem exposição a luz, contribuíram para evitar fontes externas de danos que resultariam em resultados superestimados.

A etapa de lise celular não se mostrou viável para o modelo vegetal *Lactuca sativa* nas condições testadas. Além de ser um passo extra, a quantidade de nucleóides obtidos a mais com sua aplicação não justificaram os níveis de danos observados, consideravelmente maiores em relação ao experimento realizado sem a etapa de lise.

A imersão das lâminas contendo os nucleóides inclusos em gel de agarose, em solução de desnaturação (solução de eletroforese com $\text{pH} > 13$), se mostrou mais eficiente nos maiores tempos de permanência. Seguindo recomendações de outros estudos e com base nos resultados observados, esse tempo foi definido como 30 minutos.

A voltagem que melhor se adequou aos parâmetros aqui encontrados e, ainda, em concordância com o que é relatado na literatura foi de 1 V/cm (para uma distância entre os polos da cuba de 40 cm foram aplicados 40 V), durante 30 minutos.

Na realização do ensaio cometa, aplicando os parâmetros aqui definidos, e procedendo a calibração com os indutores de danos metil metanossulfonato (MMS), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formaldeído (CH_2O), os melhores resultados foram encontrados para o MMS e o peróxido de hidrogênio. Esses compostos induziram os maiores níveis de danos no DNA, e seus mecanismos de quebra resultaram em fragmentos com maior mobilidade durante a corrida

eletroforética, formando cometas com morfologia adequada à obtenção de classificações confiáveis. Menores níveis de danos foram observados para o tratamento com formaldeído, porém, seu mecanismo de ação, associado a formação de adutos covalentes entre as fitas da molécula de DNA, reduz a migração dos fragmentos de DNA no gel, podendo resultar em uma avaliação subestimada dos danos. Contudo, a facilidade em se obter o CH₂O faz com que esse composto seja uma alternativa acessível comparada a outros indutores de danos mais caros e de mais difícil obtenção.

Referências

- Ahsan, H., Ali, A., & Ali, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. In *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02104.x>
- Alvarenga, I. F. S., dos Santos, F. E., Silveira, G. L., Andrade-Vieira, L. F., Martins, G. C., & Guilherme, L. R. G. (2020). Investigating arsenic toxicity in tropical soils: A cell cycle and DNA fragmentation approach. *Science of the Total Environment*, 698. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134272>
- Alves, T. de A., Fontes Pinheiro, P., Miranda Praça-Fontes, M., Fonseca Andrade-Vieira, L., Barelo Corrêa, K., de Assis Alves, T., da Cruz, F. A., Lacerda Júnior, V., Ferreira, A., & Bastos Soares, T. C. (2018). Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. *Industrial Crops and Products*, 114, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.071>
- Azqueta, A., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., & Collins, A. R. (2011). Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Towards a more reliable comet assay : Optimising agarose concentration , unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 724(1–2), 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.010>
- Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., & Collins, A. (2011). The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. 26(3), 393–399. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq105>
- Bandyopadhyay, A., & Mukherjee, A. (2011). Sensitivity of Allium and Nicotiana in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.002>
- Baragamaarachchi, Y. R., Weerasena, O. V. D. S. J., Handunnetti, S. M., & Samarasekara, R. (2015). Recommendations to enhance reproducibility and reliability in comet assay. *4th Global Summit on Toxicology*, 5(3), 4172.
- Brunborg, G., Rolstadaas, L., & Gutzkow, K. B. (2016). Electrophoresis in the Comet Assay. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Cabuga Jr, C. C., Joy Abelada, J. Z., Rose Apostado, R. Q., Joy Hernando, B. H., Erick Lador, J. C., Lloyd Obenza, O. P., James Presilda, C. R., & Havana, H. C. (2017). *Allium cepa* test: An evaluation of genotoxicity. *Proceedings of the International Academy of Ecology*

- and *Environmental Sciences*, 7(1), 12–19.
[http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2017-7\(1\)/Allium-cepa-test-An-evaluation-of-genotoxicity.pdf](http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2017-7(1)/Allium-cepa-test-An-evaluation-of-genotoxicity.pdf)
- Carvalho, M. S. S., Andrade-Vieira, L. F., Santos, F. E. dos, Correa, F. F., das Graças Cardoso, M., & Vilela, L. R. (2019). Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. *Scientia Horticulturae*, 245, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.001>
- Chang, C., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. (2016). Field Guide to Plant Model Systems. In *Cell* (Vol. 167, Issue 2, pp. 325–339). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.031>
- Collins, A. R., El Yamani, N., Lorenzo, Y., Shaposhnikov, S., Brunborg, G., & Azqueta, A. (2014). Controlling variation in the comet assay. *Frontiers in Genetics*, 5(SEP), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00359>
- Dhawan, A., & Anderson, D. (2016). *The comet assay in toxicology* ([2 nd ed]). Royal Society of Chemistry.
- dos Santos, F. E., Carvalho, M. S. S., Silveira, G. L., Correa, F. F., Cardoso, M. das G., Andrade-Vieira, L. F., & Vilela, L. R. (2019). Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(27), 27558–27568. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1015-x>
- Enciso, J. M., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., Olsen, A. K., López De Cerain, A., & Azqueta, A. (2018). Standardisation of the in vitro comet assay: Influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. *Mutagenesis*, 33(1), 25–30. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex039>
- Freitas, A. S., Fontes Cunha, I. M., Andrade-Vieira, L. F., & Techio, V. H. (2016). Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.017>
- Garcia, O., Mandina, T., Lamadrid, A. I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, Y., Piloto, J., & Gonzalez, J. E. (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. 556, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.035>
- Gichner, Tomáš. (2003). DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco: Cellular and acellular Comet assays. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 535(2), 187–193. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00320-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00320-0)
- Gichner, Tomáš, Ptáček, O., Stavreva, D. A., & Plewa, M. J. (1999). Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1999\)33:4<279::AID-EM4>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1999)33:4<279::AID-EM4>3.0.CO;2-K)
- Gichner, Tomas, Znidar, I., Wagner, E. D., & Plewac, M. J. (2009). The use of higher plants in the Comet assay. *Issues in Toxicology*. <https://doi.org/10.1039/9781847559746-00098>
- Jovtchev, G., Menke, M., & Schubert, I. (2001). The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00166-8)
- Kawanishi, M., Matsuda, T., & Yagi, T. (2014). Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. 2(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00036>
- Koppen, G., Azqueta, A., Pourrut, B., Brunborg, G., Collins, A. R., & Langie, S. A. S. (2017). The next three decades of the comet assay: A report of the 11th International Comet Assay

- Workshop. *Mutagenesis*, 32(3), 397–408. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex002>
- Lanier, C., Manier, N., Cuny, D., & Deram, A. (2015). The comet assay in higher terrestrial plant model: Review and evolutionary trends. *Environmental Pollution*, 207, 6–20. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.020>
- Lee, M. Y., Kim, M. A., Kim, H. J., Bae, Y. S., Park, J. I., Kwak, J. Y., Chung, J. H., & Yun, J. (2007). Alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) induces a wave of global protein hyperacetylation: Implications in cancer cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.084>
- Li, R., Lu, Z. S., Qiao, Y., Yao, H. C., Yu, F. F., & Yang, X. (2004). [Study on the formaldehyde-induced DNA damage with comet assay]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 37(4), 262–268. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15511067>
- Liman, R. (2013). Chemosphere Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and Comet assay. *Chemosphere*, 93(2), 269–273. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.076>
- Ma, T. H., & Harris, M. M. (1988). Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 196(1), 37–59. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(88\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0165-1110(88)90027-9)
- Ma, T., Xu, Z., Xu, C., Mcconnell, H., Valtierra, E., Adriana, G., & Zhang, H. (1995). The improved Allium / Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. 334, 185–195.
- Merk, O., & Speit, G. (1999). Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33(2), 167–172. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1999\)33:2<167::aid-em9>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1999)33:2<167::aid-em9>3.0.co;2-d)
- Palmieri, M.J., Andrade-Vieira, L. F., Trento, M. V. C., de Faria Eleutério, M. W., Lubert, J., Davide, L. C., & Marcussi, S. (2016). Cytogenotoxic Effects of Spent Pot Liner (SPL) and Its Main Components on Human Leukocytes and Meristematic Cells of *Allium cepa*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(5). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2809-z>
- Palmieri, Marcel José, Barroso, A. R., Andrade-, L. F., Monteiro, M. C., Soares, A. M., Henrique, P., Cesar, S., Braga, M. A., Vinicius, M., Trento, C., Marcussi, S., Davide, L. C., José, M., Barroso, A. R., Andrade-, L. F., Monteiro, M. C., Soares, A. M., Henrique, P., Cesar, S., ... Jos, M. (2019). *Polybia occidentalis* and *Polybia fastidiosa* venom : a cytogenotoxic approach of effects on human and vegetal cells of effects on human and vegetal cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1631339>
- Piperakis, S. M. (2009). Comet assay: A brief history. In *Cell Biology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9081-y>
- Pourrut, B., Pinelli, E., Mendiola, V. C., Silvestre, J., & Douay, F. (2015). Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. *Mutagenesis*, 30(1), 37–43. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu075>
- Reis, G. B. dos, Andrade-Vieira, L. F., Moraes, I. de C., César, P. H. S., Marcussi, S., & Davide, L. C. (2017). Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142(March), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.004>
- Rydberg, B., & Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *DNA Repair Mechanisms*, 465–468. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-322650-1.50090-4>
- Shaposhnikov, S. A., Salenko, V. B., Brunborg, G., Nygren, J., & Collins, A. R. (2008). Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): Loops of fragments? *Electrophoresis*, 29(14), 3005–3012. <https://doi.org/10.1002/elps.200700921>

- Silveira, G. L., Lima, M. G. F., Reis, G. B. dos, Palmieri, M. J., & Andrade-Vieria, L. F. (2017). Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere*, 178, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.048>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)