



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**TÉCNICAS DE ANÁLISE DE DANOS EM DNA E CROMOSSOMOS: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA**

ISABELE NAIARA DA SILVA AQUINO

SERRA TALHADA, PE

2019

ISABELE NAIARA DA SILVA AQUINO

**TÉCNICAS DE ANÁLISE DE DANOS EM DNA E CROMOSSOMOS: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Unidade Acadêmica de Serra Talhada, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito obrigatório à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Cássia Lima Silva Gusmão

SERRA TALHADA, PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

A657t Aquino, Isabele Naiara da Silva
Técnicas de análise de danos em DNA e cromossomos: uma revisão sistemática de literatura. / Isabele Naiara da Silva Aquino. – Serra Talhada, 2019.
78 f.: il.

Orientadora: Cássia Lima Silva Gusmão

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2019.

Inclui referência e anexo.

1. Cromossomos. 2. DNA - Análise. 3. Mutagênese. I. Gusmão, Cássia Lima Silva. II. Título.

CDD 574

ISABELE NAIARA DA SILVA AQUINO
TÉCNICAS DE ANÁLISE DOS DANOS EM DNA E CROMOSSOMOS: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Unidade Acadêmica de Serra Talhada, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito obrigatório à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, obtendo a nota _____.

Aprovada em ____/____/_____

Banca examinadora

Orientador: Profa. Dra. Cássia Lima Silva Gusmão
UFRPE/UAST

Profa. Dra. Cynthia Maria Carneiro Costa
UFRPE/UAST

Profa. Ma. Ana Luiza da Silva
UFRPE/UAST

*Acima de tudo, dedico este trabalho ao meu Deus **YHWH**, por ser a minha fonte inesgotável de inspiração, paciência e amor.*

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as minhas decisões, eles são o combustível que me move em busca de dias melhores.

AGRADECIMENTOS

Durante a construção do meu trabalho, Deus colocou do meu lado pessoas que me permitiram ver o lado bom daquilo que estava fazendo e qual a importância desta pesquisa científica para toda a comunidade acadêmica, a qual pertencço. Com eles, a caminhada na UFRPE/UAST se tornou menos cansativa. Agradeço desde já:

A minha mãe Anália, que contribuiu através das suas orações, seus conselhos, sua disposição e todo apoio que me foi dado quando eu pensei em desistir. A meu pai Messias, que se dispôs a me ajudar durante todo o curso, desde coletas, impressões de trabalhos e idas a UAST, foi essencial a sua presença para que eu chegasse até aqui. Eles me encorajaram a continuar a minha caminhada na esta Ciência tão linda como a Biologia, me dando todo amparo, amor e ajuda que precisei, foram eles que tornaram os meus dias mais fáceis e leves.

A minha orientadora, Dra. Cássia Lima Silva Gusmão, que se dispôs a me orientar mesmo que diante de um curto prazo. Pela oportunidade que tive de aprender com ela, pela paciência que teve comigo, pela sabedoria com que conduziu toda a pesquisa, e pelo amor por essa área tão linda, que é a genética, a qual nós duas temos em comum. Tenho certeza que escolhi a pessoa certa para me ajudar na concretização deste trabalho!

Aos meus avós, em especial os maternos que estão vendo a sua primeira neta concluir um curso em uma universidade.

As minhas amigas Débora de Melo e Denise Souza, que sempre foram as mais chegadas desde sempre e que me incentivaram a vencer e continuar cursando. Só nos três sabemos o que o poder da amizade pode fazer na vida de alguém.

As minhas “paquitas”, Denise Souza, Ivania Bernardino e Kerlany Janine, que se tornaram o meu maior apoio dentro e fora da sala de aula, com conselhos, incentivos e palavras de amor, além de toda a paciência e compreensão que tiveram comigo. Pelo companheirismo e parceria, e por esta amizade, que levarei para sempre dentro de mim. A elas, meu muito obrigada!

Aos coordenadores Daniel Portela Wanderley de Medeiros e Maria das Graças Santos das Chagas, por me ajudarem em todos os imprevistos que surgiram e permitirem que eu concluísse a minha graduação em tempo normal.

Aos professores da minha banca, pelo o tempo dedicado a correção e análise desta monografia, contribuindo com sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

A todos os meus colegas da comunidade Uastiana pela troca de conhecimento, fornecida e contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal. São eles: Fabiana Sabino, Neto Fernandes e Ângela Boaventura.

*“Não importa o quanto a vida possa ser ruim,
sempre existe algo que se pode fazer. Enquanto
há vida, há esperança!”*

(Stephen Hawking)

RESUMO

A avaliação nos danos em DNA e cromossomos é uma importante ferramenta na identificação e classificação das mutações, podendo ser feita mediante o uso de técnicas genéticas específicas. Com isso, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico referente as principais técnicas utilizadas na avaliação dos danos em DNA e cromossomos, observando os tipos de mutações provocadas pela exposição a agentes genotóxicos e verificando as diversas utilizações das técnicas no monitoramento ambiental e humano. Para isso, o levantamento bibliográfico foi efetuado nas bases de dados *Online* no *Google Scholar*, *SciElo (Scientific Eletronic Library Online)*, *Medline*, *Lilacs*, *Pubmed* e no banco de Teses do Periódico CAPES, considerando as seguintes palavras-chaves: *Citogenetic*”, “*DNA demage*”, “*biomarkers*”, “*mutagenic agents*” e “*genotoxicity*”. Foram considerados os trabalhos realizados nos períodos entre 2009 e 2018. Como resultado, 300 publicações científicas sobre os testes citogenéticos para avaliação dos danos em DNA e cromossomos, das quais 40 estudos foram sobre o teste de *Allium cepa*, 35 foram sobre o teste do micronúcleo, 30 sobre o teste do cometa, 25 publicações sobre o teste de Ames, 10 sobre o teste de aberrações cromossômicas, 20 sobre a técnica de hibridização *in situ* Fluorescente e 25 para o teste SMART. A identificação das substâncias, moléculas ou agentes físicos que lesionam o DNA possibilitam a elaboração de medidas que minimizem os impactos provocados pela constante exposição a agentes genotóxicos e mutagênicos.

Palavras-chave: Testes genéticos, Danos ao DNA, cromossomos, Genotoxicidade.

ABSTRACT

The evaluation of DNA and chromosome damage is an important tool in the identification and classification of mutations, and can be done through the use of specific genetic techniques. With this, this work had as objective to carry through a bibliographical survey referring the main techniques used in the evaluation of the damages in DNA and chromosomes, observing the types of mutations provoked by the exposure to genotoxic agents and verifying the diverse uses of the techniques in the environmental and human monitoring. To this end, the bibliographic survey was carried out in the Online databases at Google Scholar, SciELO (Scientific Electronic Library Online), Medline, Lilacs, Pubmed and in the Thesis Bank of the CAPES Journal, considering the following keywords: "Cytogenetic", "DNA damage", "biomarkers", "mutagenic agents" and "genotoxicity". The studies carried out in the periods between 2009 and 2018 were considered. As a result, 300 scientific publications on cytogenetic tests for evaluation of DNA and chromosome damage, of which 40 studies were on the *Allium cepa* test, 35 were on the micronucleus test, 30 on the comet test, 25 publications on the Ames test, 10 on the chromosomal defects test, 20 on the Fluorescent in situ hybridization technique and 25 on the SMART test. The identification of substances, molecules and physical agents that damage DNA allow the elaboration of measures that minimize the impacts caused by constant exposure to genotoxic and mutagenic agents.

Keywords: Genetic tests, DNA damage, chromosomes, Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do nucleotídeo.....	17
Figura 2. Pareamento das bases nitrogenadas do DNA	18
Figura 3. Níveis de organização dos cromossomos.....	19
Figura 4. Respostas ao dano no DNA.....	22
Figura 5. Micronúcleos em eritrócitos de peixes.....	28
Figura 6. Observação do cometa	31
Figura 7. Marcação de cromossomos pela técnica de FISH	36
Figura 8. Observação dos fenótipos presentes em asas de <i>D. melanogaster</i>	37
Figura 9. Número de Publicações encontradas sobre técnicas citogenéticas, no período de 2009 a 2018	41
Figura 10. . Relação do número de publicações agrupadas por tipo de marcador, na busca realizada entre o período de 2009 a 2018.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de publicações sobre estudos utilizado o teste de <i>Allium cepa</i> , relacionando com os tipos de agentes	45
Tabela 2. Número de publicações sobre estudos utilizando o teste do micronúcleo, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos utilizados	48
Tabela 3. Número de publicações sobre estudos utilizando o ensaio cometa, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos utilizados	51
Tabela 4. Número de publicações sobre estudos utilizando o teste de Ames, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos utilizados	53
Tabela 5. Número de publicações sobre estudos utilizando o teste de Aberrações Cromossômicas, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos utilizados	55
Tabela 6. Número de publicações sobre estudos utilizando hibridização <i>in situ</i> fluorescente, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos utilizados	56
Tabela 7. Número de publicações sobre estudos utilizando o teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos utilizados	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 A MOLÉCULA DE DNA	17
3.2 OS CROMOSSOMOS	18
3.3 MUTAÇÕES	20
3.3.1 Danos em DNA e Cromossomos	21
3.3.2 Mecanismos de Reparo em DNA e Cromossomos	23
3.4 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE	24
3.4.1 Teste de <i>Allium cepa</i>	25
3.4.2 Teste do Micronúcleo	27
3.4.3 Ensaio do Cometa	29
3.4.4 Teste de Ames	32
3.4.5 Teste de aberrações Cromossômicas	33
3.4.6 Hibridização in situ Fluorescente (FISH)	34
3.4.7 Teste SMART	36
4 METODOLOGIA	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA SOBRE O TEMA	40
5.2 ANÁLISES POR TESTE EM ESTUDO	45

5.2.1 Teste de <i>Allium cepa</i>	45
5.2.2 Teste do micronúcleo	47
5.2.3 Teste Cometa	51
5.2.4 Teste de Ames	53
5.2.5 Teste de Aberrações Cromossômicas	54
5.2.6 Hibridização in situ Fluorescente	56
5.2.7 Teste SMART	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7 REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o crescente aumento da população mundial implicou no aparecimento de inúmeras tecnologias que visam facilitar a vida do homem (RODRIGUES et al., 2015). Com o avanço nos diversos setores industriais, vários componentes sintéticos e naturais são soltos na atmosfera, provocando a contaminação do ar, da água e do solo, e a consequente exposição ocupacional ou acidental a determinadas substâncias que podem provocar efeitos toxicológicos (OLIVEIRA et al., 2011).

No cotidiano, todos os seres vivos, incluindo seres humanos, estão expostos a uma ampla diversidade de substâncias tóxicas, que são utilizadas nas mais diversas tarefas, dentre as quais podem-se destacar o uso exagerado de agrotóxicos, a queima de combustíveis fósseis, o manuseio de produtos de limpeza, o consumo de bebidas alcoólicas, a ingestão medicamentos sem orientação médica, dentre outros (SCHNEIDER, 2010). A frequente exposição a estes agentes pode desencadear inúmeras alterações em nível de DNA e cromossomos, principalmente durante os processos de divisão celular e síntese de proteínas, podendo implicar na perda ou alterações nas sequências de nucleotídeos, ou até mesmo em parte dos cromossomos, fazendo com que haja perda ou alteração na função do gene (PEI GUO, 2015).

Os danos induzidos no material genético provocados pela manipulação e contato com essas substâncias merecem atenção rigorosa, uma vez que na maioria dos casos, os mesmos estão relacionados ao aparecimento de doenças graves, como neoplasias e síndromes (FLORES E YAMAGUCHI, 2008). Existem duas classes de agentes causadores de danos no DNA e nos cromossomos, esses são chamados de agentes mutagênicos e genotóxicos (SANTOS et al., 2018). Os agentes mutagênicos caracterizam-se como qualquer agente, de origem química, física ou biológica que provocam mudanças permanentes na estrutura e funcionamento normal do DNA (DUSMAN et al., 2012). Já os agentes genotóxicos são compostos, de origem natural ou sintética que interagem com o material genético, gerando lesões que podem levar ao aparecimento de mutações (RIGO, 2009; VERRI, 2017). Uma mutação é evidenciada principalmente pelo aparecimento de características antes não conhecidas, podendo ser benéficas ou não (PLOMIN et al., 2016). No entanto, existem também as mutações que não provocam alterações nas sequências dos aminoácidos

formadores de proteínas, não alterando a sua função, essas são chamadas de mutações silenciosas (MARSIGLIA et al., 2010).

Sabe-se que todos os seres vivos são passíveis a mutação e que esse mecanismo é o principal responsável pela evolução de uma espécie (JABLONKA & LAMB, 2010). Quando as mutações ocorrem de maneira natural são chamadas de espontâneas, já as mutações que ocorrem como consequência à exposição de determinadas substâncias, são chamadas de induzidas (DUSMAN et al., 2012). Na natureza, a taxa de mutação é baixa, porém a constante exposição a esses agentes pode provocar um aumento desordenado na frequência de alelos responsáveis pela expressão de características indesejadas, provocando o aparecimento de doenças novas e anomalias genéticas irreversíveis (STRACHAN & READ, 2013). Existem ainda as alterações na expressão de genes, sem que haja modificações na estrutura do DNA, comandadas principalmente pela exposição a fatores ambientais, esses são chamados de mecanismos epigenéticos (VALENTE et al., 2017).

Para detectar a ação de agentes mutagênicos e genotóxicos no DNA e nos cromossomos, inúmeros testes citogenéticos foram criados, são os chamados Biomarcadores de genotoxicidade (LUCIO, et al., 2018). Essas técnicas são capazes de avaliar os danos provocados no DNA e em cromossomos, a partir do processo de monitoramento das condições físico-químicas e biológicas do ambiente, e avaliação dos riscos a exposição a determinados agentes (CAMPOS et al., 2017). Dentre os principais biomarcadores utilizados em estudos, destacam-se o teste de *Allium cepa*, teste do micronúcleo, ensaio do cometa, teste de Ames, aberrações cromossômicas, FISH, Teste SMART, entre outros (MORO et al., 2013; VALENTE, et al., 2017).

Estudos que relatam as principais técnicas de análise dos danos em DNA e em cromossomos apresentam uma imensa relevância para a comunidade científica. Desta forma, ressalta-se a importância de um trabalho como este, pois o mesmo irá identificar quais as melhores metodologias a serem seguidas, de acordo com um determinado agente, buscando impulsionar o desenvolvimento de técnicas mais eficazes e de fácil acesso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar as técnicas mais utilizadas no estudo de danos de DNA e danos cromossômicos, relacionando as suas aplicações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar os tipos de mutações provocadas pela exposição a agentes mutagênicos e genotóxicos;
- Verificar a utilização das técnicas em análises de danos ambientais;
- Analisar as diferentes técnicas e o seu uso na investigação de danos em seres vivos;
- Identificar os principais agentes causadores de mutações em de DNA e cromossomos, através de um levantamento bibliográfico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A MOLÉCULA DE DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a principal macromolécula que constitui o genoma da maioria dos seres vivos (ALBERTS et al., 2017). Ele é composto de segmentos chamados genes, que são as unidades de informação genética para a síntese de proteínas e consequente expressão de características fenotípicas, além do controle da função celular do organismo (JOAQUIM & EL-HANI, 2010). Em eucariotos, os genes possuem duas regiões específicas: exons e introns. Os exons são as regiões codificadoras de proteínas, que são conservadas no processo de transcrição. Já os introns, são sequências de DNA que não codificam proteínas, sendo eliminados antes da expressão gênica (ALELOS, 2016).

Cada gene é formado de unidades chamadas nucleotídeos, que possui três componentes básicos: uma base nitrogenada, um fosfato e um açúcar (FIGURA 1) (KLUG et al., 2010). O açúcar presente no DNA é uma 2-desoxirribose, e contém em sua estrutura 5 átomos de carbono, já as bases nitrogenadas são compostos cíclicos que estão divididos em duas classes: purinas, que possuem dois anéis e são representadas pela adenina (A) e Guanina (G), e as pirimidinas, que possuem apenas uma anel, das quais são a Citosina (C) e Timina (T) (SOLOMONS, 2013).

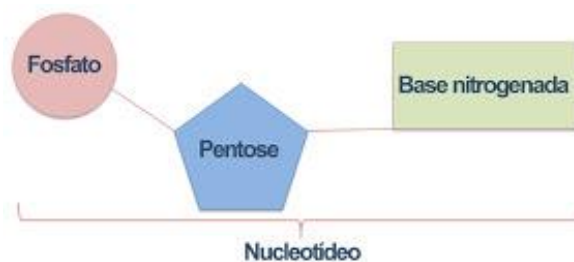


Figura 1. Estrutura do nucleotídeo.

Fonte: Universidade de São Paulo (USP)

Fonte: Pinto, 2013

A molécula de DNA está disposta em duas cadeias ligadas entre si por pontes de hidrogênio. Essas cadeias apresentam-se enroladas ao longo de um mesmo eixo, formando a dupla hélice (SCHERER & STROHSCHOEN, 2013). Na dupla hélice, os nucleotídeos de

cada uma das fitas de DNA estão dispostos de maneira oposta uns aos outros, no sentido antiparalelo (GRIFFITHS, 2016). Para o pareamento das bases nitrogenadas, a adenina de uma fita liga-se sempre a timina da outra fita e, da mesma maneira, a guanina liga-se a citosina da outra fita (FIGURA 2). As duas fitas mantêm-se unidas por ligações fosfodiéster, estabelecidas entre o grupo hidroxila do carbono 3' de um nucleotídeo e o grupo hidroxila do carbono 5' no nucleotídeo seguinte (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016).

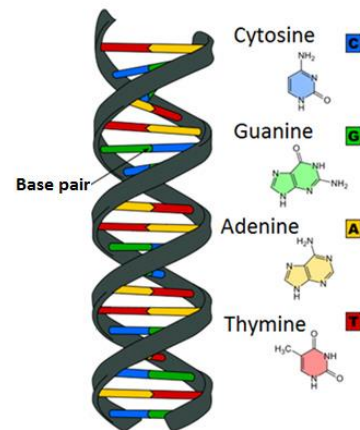


Figura 2. Pareamento das bases nitrogenadas do DNA.
Fonte: genengnews, 2015.

3.2 OS CROMOSSOMOS

No ano de 1870, o citologista Walther Flemming ao analisar o processo de divisão celular de um determinado material biológico, observou a presença de filamentos, os quais se podiam se corar intensamente, e que por conta disso foram denominados de cromatina (GROB & MCSTAY, 2014). Essa cromatina é composta de segmentos de DNA associados a proteínas. O termo cromossomo (*croma*= cor; *soma*=corpo) foi descrito em 1888 por Wilhelm Waldeyer e representa porções da cromatina que podem apresentar-se condensadas ou não (SCHEUERLEIN; HENSCHKE; KÖCKERLING, 2017). Os cromossomos encontram-se no núcleo celular (FIGURA 3), e podem ser visíveis a microscópio em uma célula metafásica (ALBERTS et al., 2017).

Durante a interfase, todo o material genético encontra-se na sua forma descondensada, pois é quando ocorre a replicação do DNA. Já na divisão celular, durante a prófase inicia-se a espiralização do DNA. Essa espiralização consiste na compactação do DNA, sendo necessária

a ação de uma proteína, chamada histona, a qual funciona como uma matriz no qual a fita de DNA se enrola, permitindo que todo o DNA caiba dentro do núcleo celular. A associação do DNA com as proteínas histonas formam uma estrutura chamada de cromatina, que podem estar condensadas ou não. Os cromossomos se formam quando a célula está prestes a se dividir, e o DNA começa a se enovelar até formar uma estrutura em forma de bastão. O cromossomo então é copiado, e cada uma das cópias é chamada de cromátide. Essas cromátides são idênticas entre si, e se unem por proteínas chamadas coesinas na região do centrômero formando as cromátides-irmãs (GRIFFITHS, 2016).

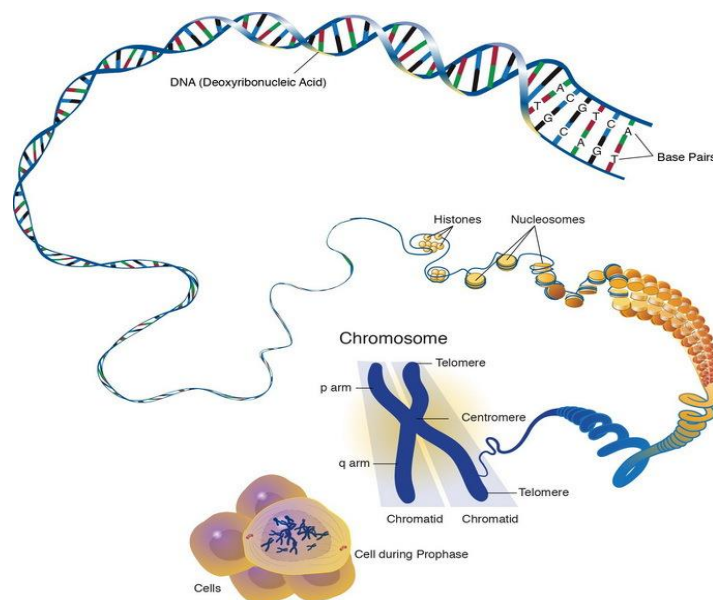


Figura 3. Níveis de organização dos cromossomos.
Fonte: Sinauer Associates Inc., 1998.

Os cromossomos metafásicos dos eucariotos são formados por duas cromátides unidas na região do centrômero ou constrição primária. Cada cromátide possui a mesma informação genética, pois surgem devido à duplicação do filamento cromossômico original, durante a interfase. As partes dos cromossomos separadas pelo centrômero são chamadas de braços, sendo denominados braços p (curtos e superiores) e q (longos e inferiores). As extremidades dos braços cromossômicos são chamadas de telômeros (DIXON, et al., 2015) O local do gene no cromossomo é chamado de *locus* gênico. Os alelos, são formas alternativas de um mesmo gene, ocupam o mesmo locus em cromossomos homólogos (FUTUYMA, 2009).

Todo o material genético dos seres vivos está compactado na forma de cromossomos, (exceto o DNA mitocondrial), os quais se distribuem de diferentes números e tamanho cromossômico de acordo com a espécie (ALBERTS et al., 2017). Nas células somáticas eucariontes, existem duas cópias idênticas de cada cromossomo, chamadas de homólogas, e as com essa característica são chamadas de *diplóides*, já os gametas (oócito e espermatozoide) possuem apenas uma cópia de cada cromossomo, com isso estas células se classificam como *haplóides* (DIXON et al., 2015). O ser humano possui 23 pares de cromossomos, dos quais 22 pares são chamados de autossomos, pois fazem parte do processo de formação das regiões somáticas que são comuns aos dois sexos, como os órgãos, e 1 par de cromossomos sexuais ou aloossomos (X e Y), responsáveis pela determinação sexual do indivíduo (GRIFFITHS, 2016).

3.3 MUTAÇÕES

Ao longo da vida, é normal que a molécula de DNA passe por inúmeras alterações em suas sequências de nucleotídeos, que podem ser provocadas por erros durante o processo de divisão celular, na replicação ou pela exposição a determinados componentes (EMBRAPA, 2010). Uma mutação pode ser definida como qualquer mudança irreversível, na sequência do DNA, que pode provocar mudanças na função do gene (HARTL & CLARK, 2010).

A ocorrência de mutações é comum a todos os seres vivos e, junto com a seleção natural, é considerada o principal mecanismo de evolução das espécies (FUTUYMA, 2009). Ela provoca o aparecimento de novos alelos numa população, e conseqüentemente aumenta a variabilidade genética, que é essencial para a adaptação dos organismos a uma determinada condição (FRANCIOLI et al., 2015). Existem ainda as mutações que provocam doenças e desajustes genéticos graves, sendo assim prejudiciais ao indivíduo (KHERA et al., 2018). É importante ressaltar que nem todas as mutações provocam à evolução das espécies, apenas aquelas que ocorrem em células germinativas (gametas), desta forma, as mutações que ocorrem nas células somáticas afetam apenas o indivíduo portador e não são herdadas pela próxima geração (HORI et al., 2019).

Existem dois tipos principais de mutações: gênicas ou cromossômicas. As mutações gênicas ocorrem quando sequências de DNA são alteradas, afetando poucos nucleotídeos, ou

até milhares de pares de bases (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016). A mutação cromossômica por sua vez, altera o número ou a estrutura dos cromossomos (GRIFFITHS et al., 2016). As mutações podem ocorrer em regiões codificadoras de genes (éxons), podendo alterar a composição dos aminoácidos e síntese de proteínas, ou em regiões não codificadoras de genes (íntros), não afetando o processo de síntese de proteínas (ALKHZOUZ et al., 2016).

3.3.1 Danos em DNA e Cromossomos

Os danos ao polímero de DNA são eventos comuns a todas as células, e estima-se que ocorram cerca de 2×10^4 lesões por dia nessa molécula (ANDRADE-LIMA, 2015). Essas lesões estão relacionadas principalmente à quebra das ligações hidrogênio entre uma fita e outra, formação de dímeros em pirimidinas, formação de adutos carcinógeno-DNA, entre outros (TUDEK et al., 2010; LIMA, 2014). Na maioria das vezes, tais danos provocam respostas celulares imediatas, que vão desde ativação de sistemas de reparo para a correção do erro, pontos de checagem do ciclo celular, resposta transcricional ou a ativação de mecanismos de morte celular (apoptose) para a eliminação das células com o DNA danificado. No entanto, se a lesão não for reparada corretamente, pode acarretar em erros nos processos de replicação do DNA, no ciclo celular e induzir o aparecimento de mutações (FIGURA 4) (KLAUNING; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010; SULCZEWSKI et al., 2014).

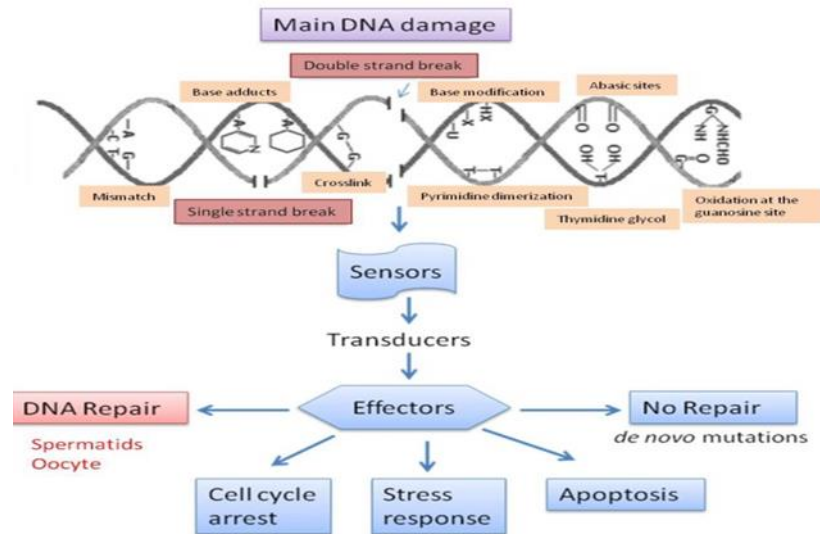


Figura 4. Respostas ao dano no DNA.

Fonte: Marín et al., 2012.

Os danos de DNA podem ser divididos em danos à fita simples (SSBs, em inglês) e danos à fita dupla (DSBs, em inglês) (YAMA; WILSON, 2013). Os SSBs são os mais comuns e geralmente não provocam alterações visíveis, sendo os mais fáceis de serem reparados, já os DSBs, além de raros, são mais tóxicos as células, e causam mutações pontuais, modificando a função do gene e até mesmo o aparecimento de aberrações cromossômicas se houver a quebra do DNA (LEWIN, 2009; MENCK & MUNFORD, 2014). Esses danos surgem devido à exposição a agentes endógenos, como o óxido nítrico, radicais livres de oxigênio e formação de nitrosaminas, e agentes exógenos, tais como a radiação, hidrólise, patógenos, fármacos, entre outros (MORIWAKI & GOSHIMA, 2016). As variações no DNA provocadas pelas mutações podem estar relacionadas ao aparecimento de neoplasia graves, como diversos tipos de cânceres e doenças degenerativas, além das síndromes de Down, Cri du Chat, Turner, Klinefelter, dentre outras (REIS; DA SILVA; BORGES, 2017).

3.3.2 Mecanismos de Reparo em DNA e Cromossomos

As mutações, de maneira geral são fenômenos raros, isso porque as células de quase todos os seres vivos desenvolveram sistemas de reparo de DNA eficientes, a fim de manter a integridade do material genético (OZTURK; DEMIR, 2011). Diversas enzimas estão envolvidas no processo de correção dos danos em DNA, e estão agrupadas de acordo com a função que exerce (KIREEVA; KASHLEV; BURTON, 2013). Para a reparação do erro em fitas simples, destacam-se os seguintes mecanismos: o reparo por emparelhamento errado de bases (MMR, *mismatch repair*), reparo por excisão de bases (BER, *base excision repair*) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*) (MORIWAKI & GOSHIMA, 2016). Para reparos de dano em dupla fita de DNA, existem dois mecanismos principais: Recombinação homóloga (HR) e junção de extremidades não homólogas (NHEJ, *Non-Homologous End-Joining*) (BRENERMAN; ILLUZZI; WILSON, 2014; RIBEIRO et al., 2015).

O MMR tem como característica principal a eliminação de bases introduzidas erroneamente durante a replicação, além do reparo de inserções ou deleções (MCCAN; EISENHAUER, 2014). Esse mecanismo está envolvido também nos processos de meiose e recombinação. O sistema MMR é altamente conservado, sendo o responsável pela manutenção da estabilidade genômica, tanto de eucariotos como procariotos (SPERKA; WANG; RUDOLPH, 2012). A bactéria *Escherichia coli* é utilizada como modelo de estudo nesse mecanismo, pois ela possui proteínas com sequências conhecidas que permitem que genes humanos sejam clonados. A deficiência em genes no sistema MMR está relacionada principalmente ao aparecimento de tumores, provando a relação entre mutação e câncer (FUKUI, 2010). O sistema BER repara lesões provocadas por agentes endógenos, como distorções na hélice do DNA geradas por alterações nas bases nitrogenadas (TUDEK & SPEINA, 2012). Esse sistema é altamente eficiente, e conta com um aparato enzimático, que junto com a DNA-glicosilase promove a remoção da base modificada e refaz a fita de DNA (JACOBS & SCHÄR, 2012; SCOTT et al., 2014). O NER é um dos mais importantes mecanismos de reparo, devido a sua versatilidade (KAMILERI; KARAKASILIOTI; GARINIS, 2012). Ele atua na remoção de lesões que causam a distorção na hélice do DNA, geradas principalmente por agentes exógenos (MORIWAKI, 2016). A atuação desse sistema envolve 30 proteínas que atuam da seguinte maneira: reconhecendo a lesão, abrindo a dupla hélice onde se localiza a lesão, incisão dupla nas extremidades da lesão, síntese de uma nova

fita de DNA usando o molde não modificado e ligação da porção 5' na nova fita a cadeia existente (SCHÄRER, 2013).

A reparação da dupla hélice de DNA acontece por recombinação e atua em lesões provocadas principalmente por agentes exógenos, como radiações ionizantes, agentes químicos, entre outros (BRENERMAN; ILLUZZI; WILSON, 2014). A recombinação homóloga atua em quebras duplas que ocorrem logo após a duplicação do DNA e exige uma cópia intacta que servira como molde. Um complexo de 16 proteínas atua no processamento do DNA, reconhecimento das sequências homólogas, religação das pontas livres de uma fita a outra, formação da junção de *Holliday* e regulação do ciclo celular (CARR & LAMBERT, 2013; JAYAKUMAR; PAL; SANDUR, 2015). Esse processo é bastante preciso e promove a recombinação efetiva da fita de DNA (RENKAWITZ; LADEMANN; JENTSCH, 2014). Já na recombinação não homóloga, as duplas quebras na fita de DNA são simplesmente religadas, sem que haja identificação da fita homóloga (ILIAKIS, MURMANN; SONI, 2015). Esse processo é passível de erros e geralmente promove o rearranjo dos nucleotídeos, provocando adições ou deleções (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010; MORIO, 2017).

3.4 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

O termo genotoxicidade refere-se aos danos gerados no material genético devido à exposição a agentes genotóxicos (BIANCHI, 2015). Esses agentes interagem quimicamente com as moléculas do DNA, provocando sua quebra (clastogenicidade) ou alterações nas sequências de nucleotídeos (mutagenicidade) (NAI et al., 2015). Quando as mutações se acumulam nas células ao longo do tempo, podem provocar modificações na divisão celular e acarretar em um câncer (carcinogênese) (KLUG et al., 2013). A genética toxicológica é a ciência responsável pelo estudo dos danos que ocorrem na molécula de DNA, bem como as mutações ocasionadas por eles (HARA et al., 2018). As substâncias capazes de reverter ou evitar as mutações sejam elas espontâneas ou induzidas, é considerada antimutagênica (STURBELLE, et al., 2010).

Inúmeras metodologias para identificação em danos no DNA e em cromossomos foram desenvolvidas diante da necessidade de se conhecer os processos mutagênicos e analisar como os agentes genotóxicos interagem com as células (MENDES; SOUZA;

JUNIOR, 2018). Esses métodos são divididos em duas classes: testes de macroescala, que identificam alterações visíveis nos cromossomos, e os testes moleculares, que detectam modificações na estrutura do DNA. No entanto, esses termos são pouco difundidos, devido todas às anormalidades cromossômicas serem geradas pelas alterações no DNA (BATISTA et al., 2018).

Os testes de genotoxicidade são realizados em organismos-testes (de procariontes até mamíferos), e buscam analisar a influência das substâncias sobre os organismos vivos. Existem também diversos testes que podem ser utilizados no biomonitoramento de ambientes aquáticos e terrestres, a partir da observação da população existente naquele local (ARCI; SILVA; CUNHA, 2014). Atualmente são conhecidos cerca de 200 testes que podem ser utilizados com as mais diversas finalidades, dentre os quais destacam-se: o teste de *Allium cepa*, teste do micronúcleo, teste do cometa, teste de Ames, teste de aberrações cromossômicas, hibridização *in situ* fluorescente, Teste de SMART, entre outros (MORO et al., 2013).

3.4.1. Teste de *Allium cepa*

A espécie *Allium cepa* é reconhecida como sendo um ótimo bioindicador de citotoxicidade e genotoxicidade de diversas substâncias, sendo um dos sistemas mais antigos para análise de aberrações cromossômicas (ALVIM, et al. 2011). Ele foi utilizado pela primeira vez em 1938 por Levan, onde o mesmo pode observar alterações na mitose de *A. cepa* provocadas pela exposição ao agente químico cochicina (KASPER et al., 2018). Como sistema teste, foi padronizado por Fiskejő G (1985), para ser utilizado na avaliação do potencial mutagênico de substâncias químicas presente no ambiente ou não, através da observação do índice mitótico e alterações no ciclo celular nas células meristemáticas dessa espécie, além da formação de micronúcleos e alterações nos cromossomos (SIQUEIRA et al, 2018).

As células de *A. cepa* são grandes, com número cromossômico reduzido de $2n=16$, que são bem visíveis e fáceis de ser corados (HERRERO; PEREZ; FERNANDEZ, 2012). Essa é a principal característica que permitiu a utilização dessa espécie na observação de aberrações cromossômicas e alterações na divisão celular (DALZOCHIO et al., 2016). Além disso, a

espécie *A. cepa* fornece uma resposta quase que imediata mediante a exposição a qualquer agente químico, possui um rápido crescimento de suas raízes, está disponível durante o ano todo e dispõe de um alto número de células em divisão (LEME & MARIN-MORALES, 2009). Uma característica crucial para a autenticação do teste *A. cepa*, é o fato das suas células assemelhar-se com as células de mamíferos, principalmente nos processos de divisão celular (HERRERO; PEREZ; FERNANDEZ, 2012). Por conta disso, esse teste é utilizado juntamente sistema de testes em mamíferos (ARRAES; LONGHIN, 2012).

O teste de *Allium cepa*, consiste no cultivo e obtenção de bulbos da cebola, sem a utilização de compostos químicos, que serve para testar a citotoxicidade e a genotoxicidade de diversos compostos. Os bioensaios são colocados em copos plásticos, contendo água destilada e, para que haja o crescimento de novas radículas. Posteriormente, as radículas são divididas em dois grupos, um de controle negativo e outro positivo. No controle positivo, deve ser adicionada a substância a ser testada junto a água, como agrotóxicos, poluentes ambientais, resíduos hospitalares ou qualquer outro composto químico. No estudo de Souza et al. (2010), o controle positivo possuía o agrotóxico glifosato. O controle negativo serve apenas para observar o crescimento normal da cebola sem a interferência de nenhum agente. Logo após o crescimento dos bulbos, as amostras devem ir para o tratamento com a substância a ser testada e deve permanecer lá durante 24 horas. Depois disso, os bioensaios contendo os bulbos devem ser tratadas com etanol 70% e refrigeradas para o uso posterior. A próxima etapa consiste na preparação das lâminas. É importante que o pesquisador tenha um número alto de células para ser analisado, para evitar erros. Segundo estudos, o número ideal de células a ser testada deve ser de 1000 células por bulbo analisado, para cada tratamento (LESSA et al., 2017).

Para a preparação da lâmina, as raízes devem ser hidrolisadas em solução de HCL por 5 minutos e depois enxaguadas em água destilada. Então, a região meristemática deve ser cortada e corada comorceína acética. Com a lamínula, as células devem ser esmagadas e o excesso de corantes retirado. Essa é a fase mais sujeita a erros a depender da força colocada durante o esmagamento da amostra, podendo rasgar as células. As lâminas então podem ser observadas através de um microscópio óptico, para análise da divisão celular, bem como o índice mitótico e as anormalidades cromossômicas.

Atualmente, o teste de aberração cromossômica com *A. cepa* é o principal bioindicador de citotoxicidade e genotoxicidade de extratos de plantas medicinais (ASARE et al., 2012; NEVES et al., 2014). É um sistema que permite a verificação em diferentes concentrações, devido o fato das suas raízes entrarem em contato direto com a substância

testada. É importante informar que esse teste é utilizado para atuar na prevenção de determinadas doenças que podem acometer o homem por conta da ingestão de certas substâncias de plantas, e para a comprovação de toxicidade de uma espécie em estudo (LEME & MARIN-MORALES, 2009).

Dentre as principais vantagens do teste de *A. cepa*, destaca-se a sua alta versatilidade, pois pode ser utilizado desde a identificação de ambientes contaminados, pode ser analisados também as alterações fisiológicas provocadas pelo uso de uma determinada substância, a partir da observação do crescimento de suas raízes e coloração, além de ser um bioensaio simples, rápido e de custo bastante acessível (FRESCURA et al., 2013; RIBEIRO et al, 2016). Os resultados obtidos através do teste de *A. cepa* tem se mostrado altamente satisfatórios, devido a sua fácil adaptação a novas metodologias de avaliação do efeito, como a exposição a agrotóxicos, efluentes industriais, rejeitos hospitalares, combustíveis fósseis, fármaco e inúmeros outros (CIAPPINA et al., 2017).

3.4.2 Teste do micronúcleo

Os micronúcleos (MN) consistem em massas da cromatina com aparência de um pequeno núcleo, delimitados por uma membrana e separados do núcleo principal (FIGURA 5) (HAYASHI, 2016). Eles formam-se a partir da quebra de cromossomos inteiros ou fragmentos acêntricos, pelo atraso na migração aos polos durante a anáfase, e estarão presentes nas células filhas, após a divisão celular (BOLOGNESI, 2015). Apesar dos micronúcleos poderem se originar naturalmente, a exposição a agentes genotóxicos aumenta drasticamente a sua formação (ANGELIERI et al. 2014). Uma possível consequência da formação dos micronúcleos é o aparecimento de neoplasias, como a eliminação ou indução de genes responsáveis pelo processo de carcinogênese (BENVINDO et al., 2017). Existe ainda a possibilidade de que indução ao aparecimento de micronúcleos possa ser utilizada para a eliminação de danos genéticos, a partir da supressão de genes danosos, como os oncogenes (CARBAJAL-LÓPEZ, 2016).

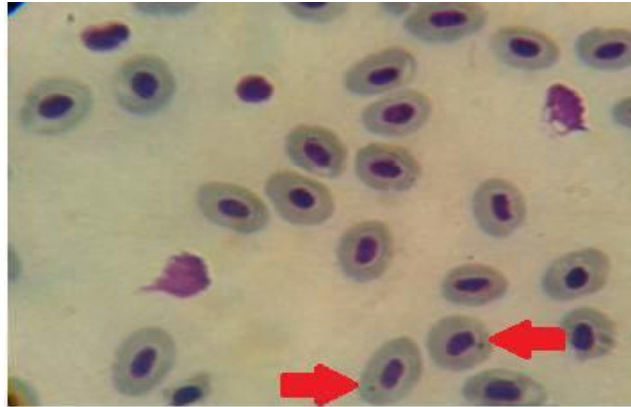


Figura 5. Micronúcleos em eritrócitos de peixes.
Fonte: TEODORO et al., 2015.

O teste do micronúcleo tornou-se uma das técnicas mais promissoras da citogenética, por fornecer respostas rápidas e baratas, mediante a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de diversos agentes, tais como fármacos, agrotóxicos, combustíveis fósseis, e na identificação de poluentes ambientais (LYA et al., 2016). É uma técnica que pode ser utilizada tanto em animais (ALIMBA; BAKARE, 2016), como em humanos (CERVENA et al., 2017).

O teste do micronúcleo pode ser realizado a partir de ensaios *in vitro* (mutação gênica em células de mamíferos) ou *in vivo* (medula óssea de roedores), e também pode ser realizado com ou sem bloqueio da divisão celular. O uso da Citocalasina B para o bloqueio da citocinese é comum em ensaios *in vivo*, sendo um aperfeiçoamento proposto por Fenech e Morley em 1985, da técnica original criada por Schmid em 1975 (RIBEIRO et al., 2003; BALLESTRERI, 2017). A Citocalasina B é um inibidor da polimerização dos filamentos de actina, que atua no bloqueio da citocinese, mas não evita a divisão nuclear, provocando o acúmulo de células binucleadas, formadas de células que passaram por um único ciclo de divisão (BOLOGNESI et al., 2017).

In vivo, os organismos testes devem ser preparados e expostos ao agente que se deseja estudar. Depois de um tempo de exposição, faz-se a eutanásia do animal e as amostras de células sanguíneas da medula óssea são usadas na preparação do esfregaço. Deve-se esperar a secagem dessas lâminas para fixá-las em metanol absoluto por 10 minutos. Em seguida, as lâminas devem ser coradas com Giemsa, lavadas com água destilada e secas ao ar, em temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas podem ser levadas para a análise em um microscópio óptico para visualização dos micronúcleos.

In vitro, os linfócitos são cultivadas em meio específico, geralmente RPMI suplementado com soro fetal bovino e fitohemaglutinina. A Citocalasina B é adicionada após 44 horas de cultivo a 37°C, e com 72 horas, o cultivo é centrifugado e despreza-se o sobrenadante. Em seguida as células são hipotonizadas com KCl, fixadas com metanol/ácido acético e concentradas por centrifugação. O “pellet” de células é ressuscitado e 2 a 3 gotas da suspensão e gotejada sobre lâminas limpas. Depois de secas, as lâminas são coradas com Giemsa (RIBEIRO et al., 2003).

Atualmente, esse teste pode ser utilizado para análise dos danos provocados por agentes anagênicos e clastogênicos, a partir da observação de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas (HAYASHI, 2016). É possível também avaliar a instabilidade genômica a partir da formação de pontes núcleo-plasmáticas provenientes de cromossomos dicêntricos, para avaliação do impacto de deficiências nutricionais em humanos (TOMAZ; FERRI; FILHO, 2017).

O ensaio do micronúcleo foi inicialmente projetado para a avaliação de eritrócitos da medula óssea de roedores (SILVA et al., 2015; YANG et al., 2016), posteriormente, com o avanço da técnica, esse teste pode ser utilizado em qualquer tipo celular, especialmente em eritrócitos periféricos de peixes, devido a sua alta sensibilidade a exposição a agentes genotóxicos, podendo assim ser utilizados para a identificação da presença de mutagênicos de ambientes aquáticos (HALLARE et al., 2016).

3.4.3 Teste do Cometa

O teste do cometa (*comet assay*), conhecido também como ensaio de eletroforese em gel de cadeia única (*Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE*) é um método simples, utilizado para quantificar os níveis de danos em DNA de células eucarióticas (ARALDI et al., 2015). Ele foi nomeado por Olive em 1989, que pode observar a aparência de nucleóides quando submetidos à eletroforese (WAGNER & PLEWA, 2017). Os nucleóides são estruturas formadas a partir do enovelamento de DNA e RNA, formando uma espécie de alça, além da matriz nuclear e proteínas (GLEI; SCHLÖRMANN, 2016). No entanto, foram Ostaling e Johanson (1984) que utilizaram da eletroforese do DNA em micro-gel em meio neutro, porém

essa técnica não era se mostrou tão precisa. Mais tarde, Singh e colaboradores, padronizaram a versão mais conhecida da técnica (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009).

Existem dois tipos de ensaios que podem ser feitos a partir do teste cometa: a versão alcalina, mais utilizada atualmente, onde é realizada num pH mais básico, e permite a identificação de vários tipos de lesões no DNA, e a versão neutra (pH=7), que permite a detecção e lesões em fita dupla do DNA.

Existem vários protocolos para a realização do teste cometa, que foram sendo adaptados de acordo com o tipo de estudo. Basicamente, os organismos-testes devem ser escolhidos e posteriormente, deve ser feita a coleta do sangue periférico para aquisição das células. Esse sangue deve ser imediatamente acondicionado em tubos com uma substância anticoagulante. As células então devem ser expostas ao agente genotóxico desejado para a realização do teste (exposição *in vitro*). Existem ainda os procedimentos que indicam que a exposição seja feita antes da coleta do sangue, ou seja, o organismo-teste deve ser exposto ao agente e só depois deve ser feita a coleta das células (exposição *in vivo*). Logo após, nas lâminas histológicas, é adicionado o gel de agarose em banho-maria, a uma temperatura controlada de aproximadamente 50°C, depois é removido o excesso de umidade da lâmina. As amostras com as células devem ser misturadas a agarose de baixo ponto de fusão cobrindo-se com a lamínula até solidificarem nessa etapa as amostras devem ser colocadas na geladeira durante 20 min a uma temperatura de 5°C. Após isso, as lamínulas são retiradas e deve ser acrescentada uma solução de lise, onde as lâminas devem permanecer por 2h ou mais. Depois da lise, as amostras serão colocadas na cuba de eletroforese e cobertas por uma solução tampão. A depender do estudo, esse tampão pode ser alcalino ou neutro. Após isso, aplica-se uma corrente elétrica nas células, e o DNA por ter carga negativa migra para fora do núcleo, quando há dano. As lâminas devem ser lavadas, secadas e posteriormente coradas e levadas para a visualização dos cometas em um microscópio óptico. A célula apresentará a aparência de um cometa, com cabeça, região nuclear e a cauda, onde ficam os fragmentos de DNA que migraram para a região do ânodo.

Essa técnica é mais abrangente e é empregada na detecção de danos diretos no DNA, como quebras da fita simples e duplas, formação de sítios álcali-lábeis, *crosslinks*, excisão de sítios de reparo, entre outros (KARLSSON; DI; DUSINSKA, 2015). Uma característica diferencial do ensaio do cometa é o fato dele permitir a detecção do dano antes do sistema de reparo atuar, o que permite a correção antecipada das lesões (FEDATO; MAISTRO, 2014).

O ensaio do cometa é utilizado para a quantificação de células individualizadas, não havendo necessidade das mesmas encontrarem em divisão (KUMARAVEL et al., 2009), essa é a principal vantagem do teste. Além disso, o ensaio do cometa é relativamente simples e de baixo custo e apresenta uma alta sensibilidade (COSTA; TEXEIRA, 2014). Esse teste não permite a identificação de mutações, porém é possível detectar as lesões provocadas por agentes mutagênicos e conseqüentemente possibilita o estudo de técnicas para o reparo desses danos no DNA, evitando assim a mutação gênica (COLLINS et al., 2014).

Esse teste pode ser realizado em pesquisas de genotoxicidade tanto *in vitro* como *in vivo* em diversos tipos celulares. Para a sua execução, as células são colocadas em uma solução de agarose, e posteriormente são lisadas para a remoção dos componentes celulares e formação dos nucleóides. Logo após, as lâminas são submetidas à eletroforese, que pode ser de dois tipos: alcalina ou neutra, a depender do ensaio. (VASQUEZ; FRÖTSCHL, 2016). Os fragmentos de DNA migram em sentido do ânodo. Quando postas para a observação, as células possuem a forma de um cometa (FIGURA 6) e os danos são analisados com o comprimento da cauda dos cometas. O tamanho da cauda reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA, quanto menores os fragmentos de DNA, maiores serão os danos (AMAYA; COLLINS, 2013; COLLINS et al., 2014).



Figura 6. Observação do cometa. A cabeça é o Nucleóide, enquanto a cauda é o DNA fragmentado. Fonte: MARTINEZ et al., 2009.

3.4.4 Teste de Ames

O teste de Ames, também chamado de ensaio de reversão de mutação em *Salmonella typhimurium*, é utilizado na avaliação da genotoxicidade e carcinogenicidade de diversos compostos, a partir da indução de mutações do tipo *frameshift* (deslocamento no quadro de leitura do DNA) ou a substituição de pares de bases, além de ser muito eficiente na análise de mutagênese ambiental (RESENDE et al., 2015 ; THORNE et al., 2016). Ele foi descrito por Ames em 1971, enquanto o mesmo estudava o operon responsável pela síntese de histidina. Ele observou que a inativação desses genes era ocasionada por mutações no genoma de *S. typhimurium*. Mais tarde, Ames percebeu que esses mutantes podiam ser utilizados no estudo de compostos potencialmente mutagênicos (MORTELMANS, 2019).

Diversas linhagens de *S. typhimurium* são empregadas na análise de mutações, o que possibilita o aumento da sensibilidade do teste (BERG, et al., 2016). Cada estirpe é modificada geneticamente para a obtenção do resultado desejado pela exposição a uma substância diferente (THORNE et al., 2018). A mutação *rfa*, por exemplo, aumenta a permeabilidade da membrada, permitindo a entrada do composto químico na célula, enquanto que a mutação *uvrB*, provoca a deleção do gene *uvrB*, tornando essas bactérias incapazes de reparar os danos em DNA (MATSUMURA et al., 2017). No entanto, a indução de mutação no gene de biossíntese da histidina é o bioensaio mais utilizado. Esse tipo de mutação impossibilita a bactéria de sintetizar esse aminoácido essencial, e impede o crescimento de *S. typhimurium* e formação de suas colônias (MORTELMANS, 2019). Porém, quando essas mesmas bactérias são expostas a substâncias capazes de provocar mutações no operon da histidina, e o gene voltar a se expressar, as mesmas conseguem crescer e se formar colônias novamente. O número de colônias formadas após a exposição de *S. typhimurium* pode comprovar o potencial mutagênico do agente estudado (MORTELMANS, 2019).

O princípio da técnica é bem simples: são escolhidas as linhagens de *S. typhimurium* com mutações do tipo *rfa* ou *uvrB*, que são incapazes de sintetizar o aminoácido essencial, histidina. Cada linhagem deve ser inserida em uma placa com um meio de cultura apropriado, com ampicilina. Posteriormente, as placas devem ser incubadas por 24h. Logo após, em um tubo, deve-se acrescentar a substância a ser estudada, junto a cultura de bactérias, ágar superfície, biotina e histidina. Essa mistura deve ser levemente homogeneizada e colocada em uma placa contendo ágar glicosado. Essas placas devem ser encubadas por 48h a uma

temperatura de aproximadamente 37°C. Após esse período, deve ser observada a formação de colônias e realizada a contagem.

O teste de Ames é empregado atualmente devido possibilidade de estudo de diversos compostos, sejam eles de origem química, biológica ou até mesmo agentes físicos (SHARIF et al., 2016). As principais vantagens do teste estão relacionadas principalmente ao seu baixo custo, alta eficácia, simplicidade de execução, flexibilidade e reprodutibilidade (CLAXTON; UMBUZEIRO; DEMARINI, 2010).

3.4.5 Teste de Aberrações Cromossômicas (AC)

As aberrações cromossômicas (ACs) ocorrem devido a mudanças na estrutura dos cromossomos, podendo ser originadas pela quebra, troca de partes cromossômicas ou por problemas durante a divisão celular (GANEM; PELLMAN, 2012). Essas mudanças podem ocorrer espontaneamente ou pela exposição a agentes químicos ou físicos, que tenham a capacidade de interagir com o DNA (KONDOH et al., 2015). Esses agentes atingem os cromossomos de duas maneiras: podendo induzir a quebra dos cromossomos durante a divisão celular (agentes clastogênicos) que ocasionarão mutações estruturais (ZHANG; LEIBOWITZ; PELLMAN, 2013), e podem ainda decorrer de problemas na segregação dos cromossomos, ocasionando alterações numéricas como aneuploidias e euploidias (agentes anaugênicos) (YANG et al., 2013).

Na maioria das vezes, as aberrações cromossômicas são letais as células, devido à quantidade de genes alterados durante a mutação, provocando danos genéticos irreversíveis, mas, existem casos onde as ACs se estabelecem, e quando atingem células germinativas podem ser transmitidas pela próxima geração (NAASSE et al., 2015). As ACs são grande responsáveis pelo aparecimento de doenças graves, como diversos tipos de cânceres e cromossomopatias, sendo também responsável por cerca de 50% dos abortos espontâneos (STRATTON ; CAMPBELL; FUTREAL, 2009; WELLESLEY et al., 2012; SOUSA et al., 2018).

O aparecimento de ACs, tem sido empregado atualmente como um dos mais eficientes indicadores de genotoxicidade e mutagenicidade (LANDAU; SLACK, 2011), e existem diversas metodologias que podem ser empregadas nas mais diversas tarefas, como no

monitoramento ambiental, avaliação do potencial genotóxico de determinados agentes químicos ou físicos, e até mesmo no estudo de problemas nos mecanismos de reparo celular, uma vez que se as lesões no DNA não forem reparadas da maneira correta, várias alterações podem ser geradas e se acumuladas durante o tempo provocam as aberrações cromossômicas (MOHRIN et al., 2010; HENG et al., 2013).

Nos testes, para a indução de aberrações cromossômicas, um determinado grupo de células em divisão é exposto a agentes químicos, e a partir disso podem ser observadas alterações como condensação exagerada dos cromossomos, degeneração do núcleo celular (picnose), condensação tardia dos cromossomos, aparecimento de micronúcleos, formação de células binucleadas, pontes cromossômicas, além de atrasos na divisão celular, todos esses fatores induzem o aparecimento de ACs (MUKHERJEE, D. et al. 2012; REDDY et al., 2012; ALVES et al., 2016; CARVALHO et al., 2017).

A metodologia desse teste é bem simples, porém apresenta como limitação principal o fato de se usarem apenas células de animais. Inicialmente, se deve coletar a amostra de sangue periférico, previamente heparinizada. Os linfócitos T devem ir para um meio de cultura RPMI 1640, contendo 20% de soro fetal bovino ou soro humano A/B, e penicilina, com ou sem estimulação mitogênica. Essas células podem ser expostas a agentes mutagênicos *in vitro* ou *in vivo*, o que é mais comum. O tempo de cultivo das células pode variar de 24h até 48h, a uma temperatura de aproximadamente 37°C. Essa cultura deve ser transferida para as lâminas, para a fixação do material. Depois de fixado, o material poderá ser corado com Giemsa a 2% por 10 min. Depois, as lâminas devem ser lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente. Posteriormente, as células podem ser analisadas usando um microscópio de luz.

3.4.6 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica que vem ganhando espaço na dentro da citogenética molecular, pois permite a identificação de sequências específicas de DNA em uma determinada região do cromossomo (BISHOP, 2010). Com o auxílio de sondas marcadas com fluorocromos, várias anormalidades estruturais e numéricas podem ser observadas (RATAN et al., 2017).

A técnica de FISH foi descrita inicialmente na década de 80, por Pinkel e colaboradores. Eles submeteram uma sequência de DNA específica marcada com biotina, à hibridização com cromossomo de interesse, posteriormente, puderam observar que regiões desses cromossomos tornaram-se fluorescentes (BISHOP, 2010; AN et al., 2017). A característica principal desse método está relacionada a capacidade que o DNA tem de se anelar com sequências complementares de DNA ou de RNA formando híbridos, baseando-se no princípio da análise de *Southern blot* (SAVIC et al., 2010; AVIV, et al., 2011). A hibridização consiste na de uma sequência alvo do DNA específica desnaturada e sondas de interesse, que interagem dinamicamente entre si (LIEHR, 2017). A sonda é uma sequência de oligonucleotídeos marcadas com substâncias fluorescentes que anelarão com a molécula alvo (STRACHAN & READ, 2012).

Para realização da técnica de FISH, os seguintes procedimentos devem ser seguidos: 1) a lâmina com material biológico deve ser preparada e a amostra fixada e permeabilizada, juntamente com as sondas marcadas, 2) ocorrerá à hibridização, 3) a amostra deve ser levada para retirar o excesso de sonda, 4) visualização do material (NEVES; GUEDES, 2012). A escolha do tipo de sonda a ser utilizada vai depender do resultado que se espera obter. As sondas diretamente marcadas possibilitarão a análise de cromossomos inteiros, regiões cromossômicas específicas, ou sequências teloméricas ou centroméricas (FIGURA 7) (LARRACUENTE; FERRE, 2015).

A técnica de FISH possui uma metodologia que pode ser adaptada de acordo com o tipo de agente a ser estudado, isso porque as sondas são específicas e possuem um alvo para região do cromossomo. As amostras com tecidos devem ser coletadas e transferidas para um tubo de ensaio, contendo meio de cultura RPMI 1640. Para realização da análise, esse tecido é colocado sobre uma placa de Petri com o meio RPMI 1640 à temperatura ambiente, e depois deve ser transferido para um tubo de centrifuga para homogeneização. Remove-se então o sobrenadante formado e acrescenta-se a amostra uma substância fixadora, e esse material deve ser armazenado a uma temperatura de -20°C até ser utilizado. As amostras devem ser enviadas novamente para a centrifuga e adiciona-se mais fixador. Toda a suspensão formada é posteriormente disposta sobre uma lâmina. Essas lâminas devem ser tratadas com uma solução de 2XSSC durante 5 min a 37°C e enxaguadas com água destilada. Nessa hora, adiciona-se a solução contendo as sondas de interesse sobre as lâminas tratadas anteriormente, e a amostra deve ser vedada e aquecida a uma temperatura de aproximadamente 75° C durante 5 min. Posteriormente, as lâminas são colocadas em câmara úmida escura para a hibridização

das sondas. Após a hibridização, as lâminas devem ser lavadas, desidratadas e colocadas para secar, e só então, as amostras devem ser coradas. Após isso, pode-se observar os resultados.

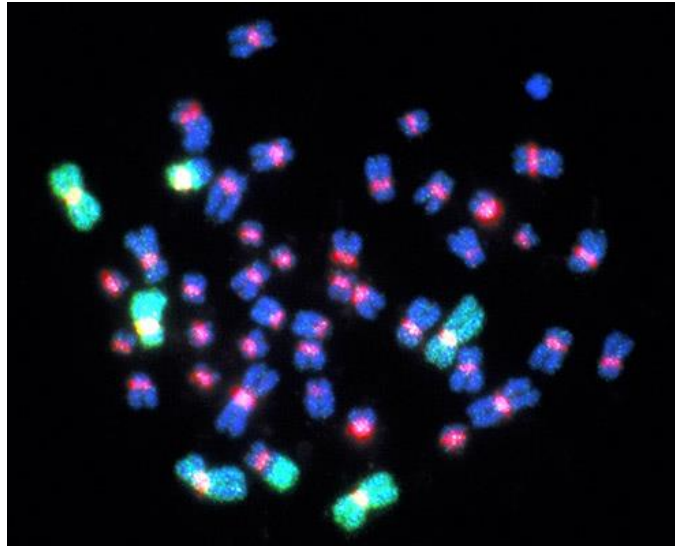


Figura 7. Marcação de cromossomos pela técnica de FISH.

Fonte: FLEURY medicina e Saúde, 2015.

A técnica de FISH permite a análise de danos genéticos provocados por diversos agentes genotóxicos, além de mapeamento genético, monitoramento das condições ambientais, na biologia evolutiva, entre outros (CHUNG; LIN; DONG; LI, 2017). Atualmente é a técnica mais procurada para o diagnóstico de doenças graves, como diversos tipos de cânceres e síndromes genéticas (CHAUFFAILLE, 2010; PRESS et al., 2016). FISH é a principal metodologia da citogenética molecular, sendo a mais utilizada em laboratórios de análises clínicas por ser uma técnica altamente sensível, específica e confiável (FAGGIOLI; VIJG; MONTAGNA, 2011; LIEHR, 2017).

3.4.7 Teste SMART

O teste SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) é capaz de detectar agentes mutagênicos e recombinogênicos de compostos químicos. Foi desenvolvido por Graf et al. (1984), e detecta tanto mutações pontuais no DNA, ou alterações em cromossomos,

como deleções, translocações e recombinações (ANDRADE et al., 2014; KOKSAL; GURBUZEL, 2015). A partir desse teste, é possível observar os mecanismos que levam a perda da heterozigose, através de fenótipos distintos, identificados nas asas dos adultos de *Drosophila melanogaster*, que surgiram devido mutações ou recombinações (LOMBARDOT et al., 2015).

O teste SMART utiliza-se de células, chamadas discos imaginais, que se proliferam separadamente até a diferenciação, durante a metamorfose. Durante o estágio embrionário das larvas de *D. melanogaster*, essas células durante a divisão mitótica podem sofrer diversos eventos genéticos, que podem ser identificados nas asas das moscas adultas. Essas alterações podem gerar clones das células mutantes que podem ser observadas nas manchas das superfícies dessas asas (ZAFRED et al., 2016). As mutações podem alterar o número de cerdas ou a forma das cerdas das asas (SPANÓ et al., 2016). Existem dois genes marcadores utilizados no teste SMART: cerdas com pelos múltiplos (*mwr*) e cerdas alargadas (*flare*, *flr³*) (FIGURA 8) (SARIKAYA et al., 2016). Essas características possibilitam a identificação de diferentes danos genéticos, permitindo a quantificação desses danos, tanto de origem mutacional ou recombinacional (RAND, 2010; GAIVÃO et al., 2014).

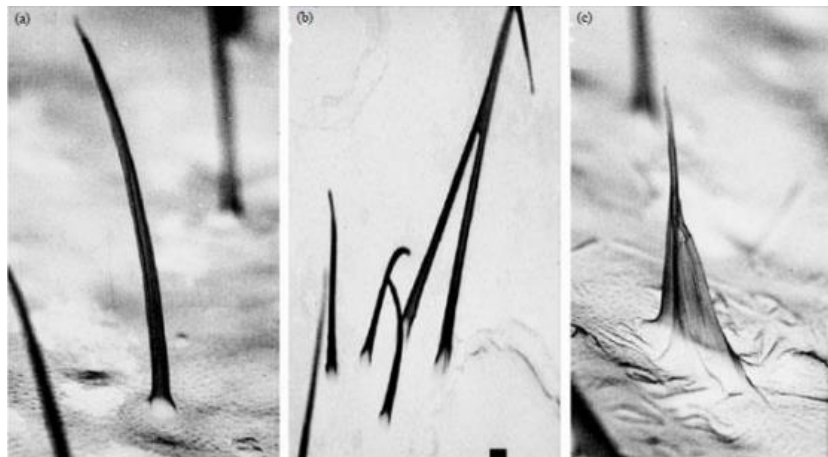


Figura 8. Observação dos fenótipos presentes em asas de *D. melanogaster*. a- cerdas normais; b- cerdas múltiplas (*mwr*) e c- cerdas alargadas (*flr³*).
Fonte: ZAFRED et al., 2016.

Essa técnica utiliza-se de células somáticas em uma só geração. Para realização do teste SMART, são selecionadas larvas geradas pelo cruzamento de fêmeas *flr3* (*flare*) virgens e machos *mwh* (pelos múltiplos) de *D. melanogaster*. Essas larvas devem ser transferidas para tubos plásticos meio de cultivo composto por 1,5 g de purê de batatas instantâneo, e tratadas

com a substância a ser testada, dissolvidos em etanol e água destilada. Após a eclosão, os adultos coletados devem ser tratados com etanol 70% e estocados em tubos plásticos, para posterior análise dos fenótipos das asas. Para observação das mutações, deve-se identificar alterações fenotípicas duas vezes maior que no grupo controle.

4 METODOLOGIA

Para a abordagem do tema em estudo, foi feita uma revisão sistemática de literatura, seguindo o protocolo de GALVÃO E PEREIRA (2014), o qual permite a realização de uma análise mais criteriosa de estudos primários, possibilitando uma melhor investigação do assunto desejado. A partir disso, busca-se verificar como as técnicas aplicadas ao estudo de danos de DNA e danos cromossômicos, causadas por agentes mutagênicos estão sendo tratadas no meio científico, para auxiliar pesquisadores sobre novos direcionamentos acerca do tema.

Para a seleção do material desejado, foram utilizadas plataformas de pesquisas científicas, mediante uma busca de dados *Online* no *Google Scholar*, *SciELO (Scientific Electronic Library Online)*, *Medline*, *Lilacs*, *Pubmed* e no banco de Teses do Periódico CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), escolhendo estudos realizados nos últimos 10 anos, ou seja, de 2009 a 2018. Como principais conceitos-chaves foram utilizados: em português “Citogenética”, “biomarcadores”, “agentes mutagênicos”, “danos em DNA”, “lesões”, “genotoxicidade” e “cromossomos”, em inglês “*Citogenetic*”, “*DNA damage*”, “*biomarkers*”, “*mutagenic agents*” e “*genotoxicity*”.

O trabalho foi delimitado em torno de estudos originais sobre as principais metodologias de análise e sobre quais são os fatores que provocam danos na molécula de DNA e em cromossomos, mediante a ideia de que o material genético pode sofrer alterações em sua estrutura pela exposição a agentes do cotidiano.

Foram considerados para a análise, somente os estudos que utilizaram as técnicas na detecção de danos no DNA e em cromossomos e a identificação dos agentes genotóxicos e/ou mutagênicos. Além disso, só foram incluídos trabalhos informações sobre: nome do periódico, o ano da publicação, autor principal e colaboradores, identificação da instituição de pesquisa, o tipo do teste e o agente físico ou químico estudado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA SOBRE O TEMA

Neste estudo, foram analisadas as principais técnicas de avaliação em danos na molécula de DNA e nos cromossomos, considerando as publicações científicas que abordavam quais substâncias provocavam lesões no material genético dos seres vivos, incluindo plantas e animais, além do uso na avaliação do monitoramento das condições ambientais de ecossistemas expostos a agentes genotóxicos e mutagênicos.

O levantamento bibliográfico resultou em 300 artigos científicos que abordavam o tema técnicas de análise nos danos em DNA e cromossomos de maneira geral. Desses trabalhos, foram selecionados aqueles que encaixavam nos critérios da pesquisa, como descrever o procedimento realizado, qual agente era investigado, quais tipos de organismos eram analisados e a sua relevância para a comunidade científica, resultando em 185 artigos. Os estudos distribuíram-se da seguinte forma: 40 estudos para o teste de *Allium cepa*, 35 estudos para o teste do micronúcleo, 30 para o teste do cometa, 25 estudos para o teste de Ames, 10 estudos para teste de aberrações cromossômicas, 20 estudos para a hibridização *in situ* Fluorescente e 25 estudos para o teste SMART.

Um dos critérios de inclusão dos trabalhos foi os mesmos terem sido realizados nos últimos 10 anos. Na figura 9, pode-se observar o crescente aumento na de publicação entre os anos de 2009 e 2018.

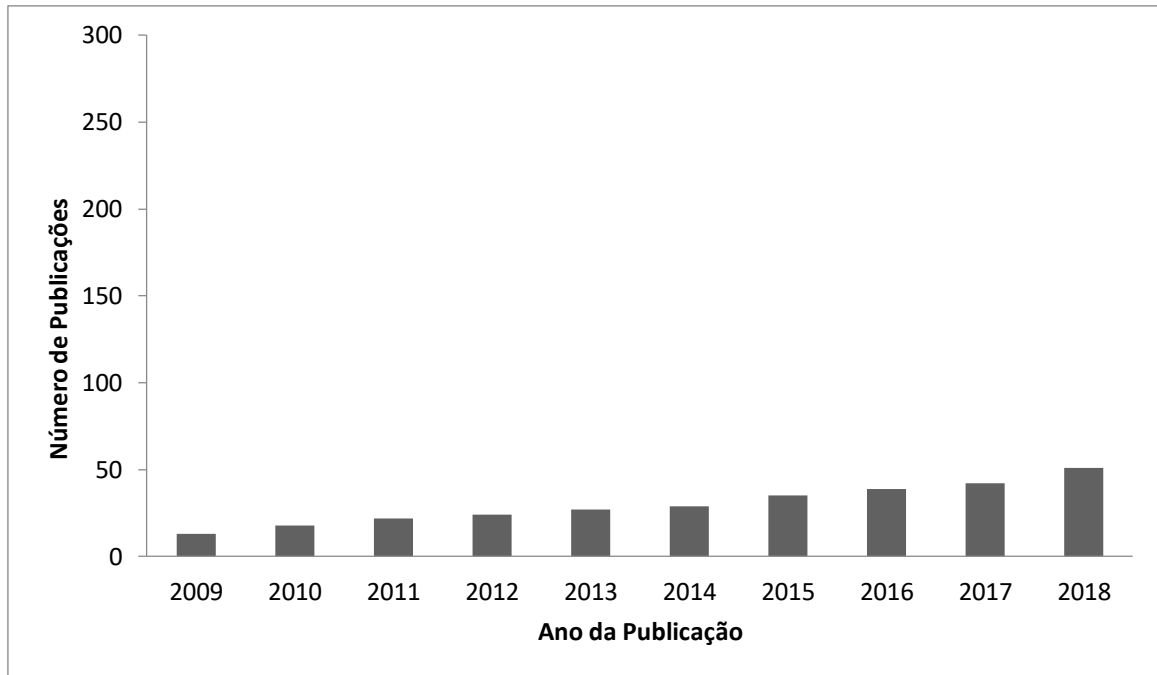


Figura 9. Número de Publicações encontradas sobre técnicas citogenéticas, no período de 2009 a 2018.

Pode-se atribuir esse aumento na utilização das técnicas de análise de danos no DNA e em cromossomos, a preocupação dos pesquisadores em entender os processos que provocam as lesões no material genético, devido a crescente exposição a agentes genotóxicos e mutagênicos. Segundo Valente e colaboradores (2017), a utilização de técnicas específicas para avaliação desses danos, é fundamental para detecção de danos precoces e a implementação de medidas preventivas e diminuidoras contra o contato com esses agentes. O aumento dessa exposição é ocasionado principalmente pelo desenvolvimento das indústrias, que expõem as populações a substâncias químicas nocivas a saúde dos seres vivos. Scherer e Strohschoen (2013) afirmam que diversos agentes genotóxicos, tais como agrotóxicos, combustíveis, aditivos alimentares e conservantes interagem com a molécula de DNA e alteram a sua estrutura, podendo acarretar em mutações prejudiciais.

Em um estudo realizado por Belcavello e colaboradores (2017), é possível afirmar que as plantas possuem substâncias bioativas desconhecidas, que muitas vezes provocam de reações alérgicas a interações com diversos tipos celulares, provocando alterações na molécula de DNA. Existe ainda a preocupação com a população que está exposta a determinados compostos, devido unicamente ao seu estilo de vida. O estudo de Ferigolo e Sagrillo (2013) analisou a atividade carcinogênica do chimarrão em pessoas que tem o hábito

de consumir todos os dias e demonstrou a ação genotóxica pelo teste do micronúcleo. Sabe-se que o câncer se inicia devido ao acúmulo de lesões no DNA, que se prolongam com tempo e alteram a fisiologia da célula, provocando a divisão desacelerada e formação de tumores. Entender a natureza dessas lesões e como essas substâncias interagem com a molécula de DNA é crucial para alertar a população dos riscos que as mesmas correm. Ballestreri (2017) descreve inúmeros agentes carcinogênicos que todos os seres vivos estão expostos, destacando: fármacos, conservantes alimentares, poluição de automóveis, gasolina, além de agentes biológicos, como a radiação ultravioleta e microrganismos.

Outra área em crescimento de publicações é a de biomonitoramento das condições ambientais. São diversos estudos, de diversas categorias, que visam entender principalmente a relação entre poluição ambiental com o aparecimento de anomalias em diversas espécies de plantas e animais. Xisto et al. (2017), estudou os efeitos da poluição atmosférica em espécies vegetais. Eles puderam observar que as mutações ocorreram principalmente em células-mães, o que aumenta a possibilidade dessas alterações serem perpetuadas nas gerações seguintes. Já Egito analisou a presença de agentes mutagênicos em água de rios poluídas, e comprovou que certas substâncias provocaram alterações na proliferação celular e aumento na frequência de aberrações cromossômicas nos organismos estudados.

Quando se analisa as publicações por tipo de técnica no período de 2009 a 2018, foram encontrados 40 artigos sobre o teste de *Allium cepa*, representando 22% das publicações, 35 artigos sobre o teste do micronúcleo, com 19%, 30 artigos sobre o teste do cometa, representando 16%, 25 para o teste de Ames, representando 13%, 10 artigos para teste de aberrações cromossômicas, com 5%, 20 artigos para a hibridização *in situ* Fluorescente, representando 11% e 25 estudos sobre o teste SMART, representando 14% (FIGURA 10).

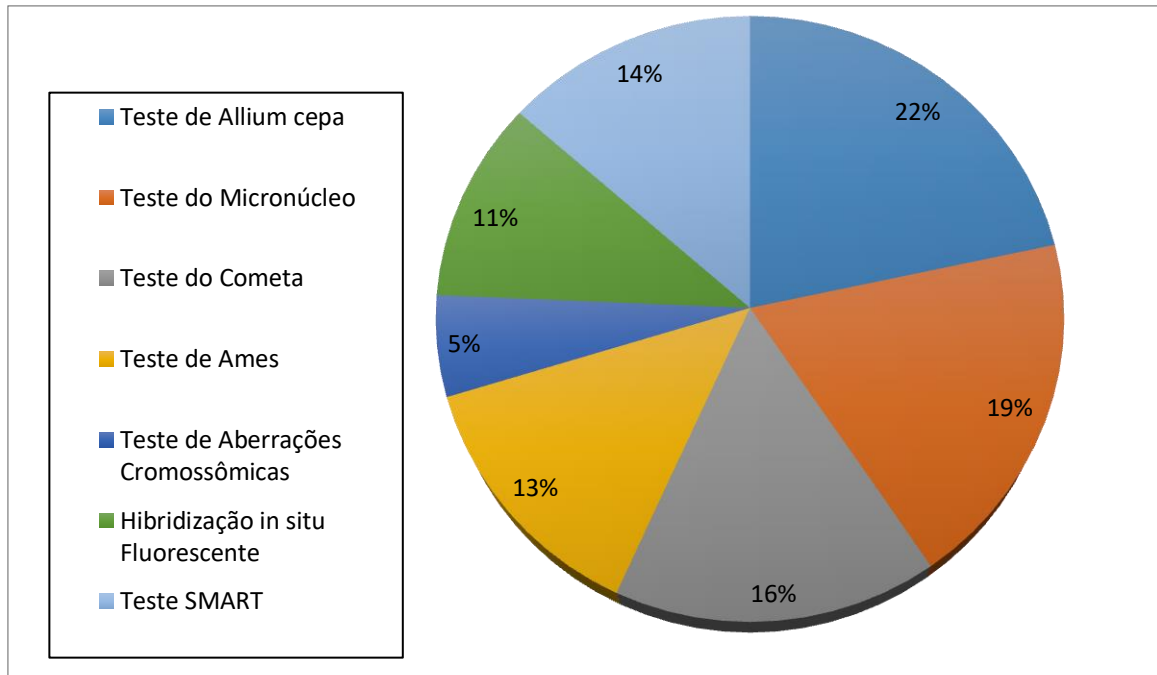


Figura 10. Relação do número de publicações agrupadas por tipo de marcador, na busca realizada entre o período de 2009 a 2018.

O teste de *Allium cepa* possui o maior número de publicações, e isso pode ser devido ao fato de ser o teste mais antigo. Carvalho et al. (2018) comprovou essa afirmação e acrescentou que o grande número de publicações está ligado também ao fato da cebola ser um vegetal de fácil manuseio e armazenamento e também por estar disponível o ano inteiro. Pode ser observado também que o grande uso do uso dos bioensaios de *A. cepa* se deve ao fato dessa técnica ser validada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pelo Programa Internacional de Química e Segurança Social (IPCS) e pelo Programa das Nações Unidas para Meio Ambiente (PNUMA), como sendo o teste mais eficiente para detecção de genotoxicidade. Foi observado também, no estudo realizado por Silva e Cariello (2017) que o teste de *A. cepa* é o sistema-teste mais fácil de ser adaptado, a depender da amostra utilizada, com isso são várias as metodologias que podem ser encontradas na literatura.

Para o teste do micronúcleo, as publicações apresenta-se como o segundo teste com maior número de publicações, devido o fato de essa técnica apresentar baixo custo, alta eficiência e uma execução simples, podendo ser modificada de acordo com o agente estudado. Além disso, os micronúcleos são estruturas que podem ser visíveis em qualquer tipo celular exposto a agentes tóxicos, com isso, vários organismos-testes podem ser utilizados nas análises (BALLESTRERI, 2017).

O teste do cometa é uma técnica muito utilizada para o monitoramento de lesões no DNA e é uma ferramenta útil para entender os mecanismos que reparo do DNA. Londero et al. (2013) descreveram que por ser um teste que necessita de aparelhos específicos, há uma limitação no seu uso. O uso do ensaio do cometa está sempre associado com outro teste, principalmente o teste de micronúcleo, o que permite uma maior veracidade nos resultados (RODRIGUES et al., 2009).

O teste de Ames é comumente utilizado para o monitoramento ambiental, sendo um dos mais recomendados pelo Órgão de Controle Ambiental dos Estados Unidos (EPA). Apesar de ser um teste bastante eficiente, a sua principal limitação está relacionada a dificuldade de ter as cepas das bactérias mutantes disponíveis.

O teste de FISH é uma técnica da citogenética molecular que vem ganhando bastante espaço na análise de danos no material genético. O crescente aumento no número de publicações sobre a FISH está relacionado principalmente a sua alta especificidade e sensibilidade. Porém, é uma técnica que apresenta inúmeras limitações que comprometem a sua utilização (Neves e Guedes, 2012). O grande problema está nos resultados falso-negativos que ocorrem, devido, em alguns casos, baixa disponibilidade de moléculas de rRNA para a realização do anelamento. Outra limitação da técnica é o risco de ocorrer marcações inespecíficas em regiões indesejadas de cromossomos.

O teste SMART é apresentado na literatura como sendo altamente eficiente, mas de execução limitada. Rigo (2009) explica que isso ocorre devido ao fato do teste necessitar da realização do cruzamento entre linhagens de *Drosophila melanogaster* específicas para cada tipo de análise a ser realizada, o que torna o teste dispendioso. Perkhulyn et al. (2015) explica que quanto mais simples for o teste, maior a probabilidade do mesmo ser realizado com maior frequência, e que muitos resultados obtidos através do teste SMART podem ser obtidos com ensaios mais simples.

O teste de aberrações cromossômicas possui um baixo número de publicações, pelo fato de existirem inúmeras metodologias que identificam essas alterações nos cromossomos, que tem uma análise mais rápida e fácil. Porém, a maioria desses testes, como o do micronúcleo e ensaio do cometa, não permitem a visualização dos cromossomos, apenas os danos que ocorreram devido à exposição a determinados agentes. Com isso, metodologias que permitem a visualização das alterações, tanto numéricas ou estruturais dos cromossomos são utilizadas quando o objetivo é detalhar o tipo de dano no cromossomo.

5.2 ANÁLISES POR TIPO DE TESTE EM ESTUDO

5.2.1 Teste de *Allium cepa*

O teste de *A. cepa* foi a principal técnica utilizada na identificação de danos em DNA e em Cromossomos. Dentre as suas principais utilidades, podemos citar o biomonitoramento ambiental, como da água e solo contaminados, toxicidade do extrato de plantas, potencial mutagênico de fármacos sintéticos, entre outros. A tabela 1 mostra as principais utilizações do teste *A. cepa* encontradas nos estudos.

Tabela 1. Número de publicações sobre estudos utilizado o teste de *Allium cepa*, relacionando com os tipos de agentes.

TIPO DE ESTUDO	AGENTE TESTADO	NÚMERO DE PUBLICAÇÕES
Biomonitoramento ambiental	Resíduos industriais, petróleo, BTEX, poluentes atmosféricos, resíduos hospitalares	16
Toxicidade de Extrato de plantas	-	10
Toxicidade de fármacos	Dipirona, paracetamol	8
Agrotóxicos	Inseticidas, pesticidas, fitofarmacêuticos	6

Dentre as principais utilidades, o teste de *A. cepa* é aplicado no monitoramento ambiental, onde foi analisado principalmente o potencial mutagênico de poluentes em corpos d'água. No estudo de Oliveira e colaboradores (2011) é notável que a composição química dos resíduos industriais que são lançados em rios na cidade de Tremembé (SP) é uma das principais causas de mortalidade dos animais e da vegetação presente no ambiente. Utilizando o teste de *A. cepa*, foi possível comprovar que as atividades mutagênicas dos compostos despejados nos rios era alta, e que a depender do tipo de agente, as lesões podem ser intensas a ponto de provocar mutações irreversíveis. Em outro estudo realizado por Herrero et al. (2012) é comprovado a toxicidade de compostos muito comuns em efluentes industriais, que

provocaram alterações nas raízes de *A. cepa*, constatando a importância do teste para determinação do impacto ambiental.

A metodologia de *A. cepa* é simples, mas eficaz, e é muito utilizado em pesquisas no mundo inteiro. Radić e seus colaboradores (2010) estudaram os efeitos citotóxicos e genotóxicos de um rio na Croácia, identificando diferentes alterações no crescimento e desenvolvimento do vegetal *A. cepa*, além do aparecimento de aberrações cromossômicas. Em outro estudo, Akinboro et al. (2012) verificou a presença de agentes genotóxicos e mutagênicos em um rio na Malásia, e avaliou os efeitos colaterais desses agentes no vegetal *A. cepa*. Foi então observado alterações na divisão celular e em problemas nos cromossomos, como a formação de pontes anafásicas, cromossomos em anel e quebras. Outra preocupação levantada no estudo foi à utilização de água contaminada com poluentes para a irrigação agrícola, o que comprova ainda mais a importância de estudos do tipo.

Outro tipo de estudo importante que pode ser realizado a partir do teste de *A. cepa*, é a análise genotoxicidade do extrato de plantas. Com o aumento no consumo de fitoterápicos, é importante compreender se as substâncias químicas provenientes do metabolismo das plantas têm a capacidade de interagir com o DNA e provocar efeitos clastogênicos ou mutagênicos.

Tedesco et al. (2012) afirma que a maioria das vezes, a ativação dos compostos químicos das plantas está relacionada ao seu modo de uso. Os extratos são comumente preparados por infusão ou decocção, que são métodos que se utilizam do aumento da temperatura para a obtenção do princípio ativo desejado. Simões et al. (2010) afirma que as substâncias podem ser alteradas com a variação da temperatura. Em outro estudo realizado por Lacerda e colaboradores (2014), foram analisados os efeitos do extrato de jatobá sobre as células de *A. cepa*, e as alterações mais significativas tratou-se da diminuição no índice mitótico, comprovando a ação citotóxica do Jatobá. Mas os resultados para alterações cromossômicas foram negativas, mostrando a importância desse teste para comprovar que nem todas as substâncias podem provocar danos no DNA.

Existem diversos estudos na literatura utilizando o teste de *A. cepa* que comprovam a citotoxicidade de diversas famílias botânicas tais como Fabaceae, Euphobiaceae e Asteraceae. É bastante comum observar também alterações no índice mitótico, ou indicação de que as substâncias químicas presentes nessas plantas podem ser carcinogênicas. Aquino et al. (2017) comprova que a muitas neoplasias são ocasionadas por interações das células com determinados agentes e não necessariamente com o DNA, pela ação citotóxica da substância.

Estudos que avaliam o potencial mutagênico de fármacos estão em crescimento no mundo inteiro, devido o aumento do uso indiscriminado de remédios. Essa preocupação fez com que vários medicamentos de diversos efeitos fossem testados. Rego e colaboradores (2015) testaram o potencial mutagênico de dipirona sódica e do paracetamol em células de *A. cepa*, e obtiveram como resultado um aumento significativo no número de aberrações cromossômicas em todas as concentrações testadas de paracetamol. Para a dipirona sódica, além do aparecimento de danos cromossômicos, houve também uma diminuição no índice mitótico. Porém, esse estudo contradiz com os resultados obtidos por Lessa et al. (2017) que analisou a capacidade do carvão mineral em diminuir o potencial mutagênico do paracetamol. Eles observaram que poucas foram as alterações provocadas nas células de cebola, e que houve um aumento no índice mitótico, resultados contrários a todos os outros estudos. Isso mostra que o teste de *A. cepa* não é só importante para avaliar o potencial mutagênico de substâncias, mas como também pode ser utilizado na observação da reversão das lesões no DNA e em Cromossomos.

Um dado importante no que se diz respeito ao teste é que em 99% dos trabalhos levantados, mesmo sem o aparecimento de lesões cromossômicas nas células, foi possível observar que houve a diminuição imediata no crescimento das raízes de *A. cepa*, quando expostas aos agentes genotóxicos, comprovando a eficácia para a análise de alterações citotóxicas provocadas por determinadas substâncias.

Com o passar do tempo, a metodologia de *A. cepa* se mostrou fácil, rápida e eficaz na análise dos danos em DNA e em cromossomos, sendo uma das mais aplicadas no mundo inteiro. Pode ser utilizada para testar uma infinidade de agentes mutagênicos, que vão desde contaminantes ambientais, como poluição, combustíveis fósseis, medicamentos e extratos de plantas, até mesmo para comprovar que nem todos os compostos provocam alterações genéticas. Não foram encontrados trabalhos que limitem o uso da técnica, isso em decorrência da sua completude e alcance total dos objetivos.

5.2.2 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo é simples, e seu uso vem crescendo nos últimos anos, uma vez que ele permite a avaliação da genotoxicidade de compostos das mais diversas origens, tanto

química, física ou biológica. Essa técnica pode ser realizada através de testes in vitro, onde se utiliza de células, geralmente linfócitos humanos ou in vivo, feito em células da medula óssea de camundongos. Mas, com o passar do tempo, esse teste começou a ser empregado na análise de genotoxicidade em outras células, principalmente nas células da mucosa oral e em eritrócitos de peixes.

São diversas as análises que podem ser realizadas utilizando o teste do micronúcleo, podendo ser empregado principalmente na análise de danos cromossômicos em mamíferos, incluindo humanos. Na tabela 2, podem ser observados as mais diversas utilidades do teste de MC.

Tabela 2. Número de publicações sobre estudos utilizando o teste do micronúcleo relacionando com o tipo de agentes genotóxicos estudados.

TIPO DE ESTUDO	AGENTE ESTUDADO	NÚMERO DE PUBLICAÇÕES
Exposição a agrotóxicos	Pesticidas, inseticidas, herbicidas	4
Toxicidade de plantas	Látex, Nicotina, extrato de plantas	13
Monitoramento ambiental	Efluentes em rios, poluição atmosférica, metais pesados	10
Toxicidade de produtos estéticos	Botox, aparelhos odontológicos, cremes	6
Toxicidade de fármacos	Esteroides anabolizantes, dipironas	2

O teste do micronúcleo é usado na identificação de danos cromossômicos, induzidos por agentes genotóxicos, já que os micronúcleos são estruturas formadas a partir de quebras de cromossomos acêntricos. Os danos podem ser classificados de acordo com o tamanho e quantidade de micronúcleos formados nas células e o aumento na frequência de micronúcleos pode indicar o grau de periculosidade de uma determinada substância.

De acordo com Verri et al. (2017), o teste do micronúcleo é empregado principalmente no estudo de danos em cromossomos provocados por uso de plantas. É observado que desde a antiguidade, o homem se utiliza de plantas medicinais para tratar diversas doenças, obtendo os extratos pelos meios de infusão e decocção e maceração do vegetal desejado. Belcavello et al. (2012) estudaram a ação de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal muito utilizada popularmente no tratamento de diversos tipos de cânceres. Como resultado, eles observaram a presença de micronúcleos nos eritrócitos de ratos, quando expostos a determinadas

concentrações por muito tempo, comprovando a ação genotóxica e citotóxica dessa planta. É um estudo importante porque demonstra que o uso indiscriminado de extratos de plantas medicinais pode contribuir no aparecimento de alterações genéticas.

Para o monitoramento ambiental, o teste do micronúcleo é aplicado em diversos organismos como indicadores de poluição, dentre os quais se destaca a espécie vegetal *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* que é muito utilizada como indicadora da qualidade do ar. No estudo de Xisto et al. (2017) buscou-se analisar os efeitos genotóxicos de poluentes atmosféricos através da presença de micronúcleos em *T. pallida* cv. *purpurea*. Eles observaram um aumento elevando na frequência de micronúcleos nas células-mães de grão de pólen que estavam em locais com altos índices de poluição em comparação ao grupo controle. Esse estudo corroborou com o realizado por Teixeira e Barbério (2012) que comprovaram a eficácia do sistema de teste do micronúcleo associado a *T. pallida* cv. *purpurea* na análise das condições ambientais de uma região.

Diversos foram os estudos encontrados ilustraram o potencial mutagênico de compostos presentes na água, principalmente em rios e estuários. No estudo de Dias et al. (2012), foram observados a presença de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em células de peixes que habitavam uma lagoa contaminada com lixo urbano. Através da observação dos danos cromossômicos, é possível alertar os órgãos de saúde pública quanto ao risco de contato da população com essa água contaminada e criar medidas que visem monitorar os ambientes aquáticos e tentar reverter a situação de poluição.

Mota e colaboradores (2009) estudaram a contaminação de um rio que fornecia peixes para alimentação da população. Eles observaram a presença elevada de micronúcleos nas células de tilápias e indicaram a presença de contaminantes com potencial genotóxico no rio. A partir desses resultados, foi possível afirmar que o consumo desses peixes com alterações cromossômicas podem trazer riscos para a população. Estudos do tipo são importantes não só para a identificação de agentes genotóxicos e mutagênicos em água, mas também para alertar aos órgãos responsáveis sobre medidas de prevenção e controle que devem ser implementadas para evitar e/ou diminuir os efeitos da poluição, tanto dos animais, como em humanos.

Faria e Braga (2015) investigaram a interferência do consumo de bebidas alcoólicas e o uso do aparelho ortodôntico no aparecimento de micronúcleos em células da mucosa oral de estudantes universitários e encontraram resultados positivos para essas alterações cromossômicas. A presença dos micronúcleos nem sempre serve como indicadores que a

pessoa está pré-disposta a desenvolver neoplasias malignas, mas afirmam que a frequente exposição a agentes mutagênicos pode sim causar danos que culminam em mutações malignas.

O hábito de fumar, principalmente em público, expõe as pessoas a fumaça do cigarro, que é tão grave quanto o próprio consumo. Paumgarten e seus colaboradores (2017) observaram a presença de lesões teciduais em diversos de ratos expostos a fumaça do cigarro, além da presença de micronúcleos em diferentes células, o que comprova o perigo que o cigarro apresenta ao organismo e mostra que o teste do micronúcleo é uma metodologia simples e acessível para estudos do tipo.

Em procedimentos estéticos, tais como técnicas de clareamento bucal e de pele, cremes emagrecedores, aparelhos odontológicos, produtos para cabelo entre inúmeras outras, são utilizados compostos químicos e agentes físicos, e o seu uso indiscriminado pode provocar efeitos adversos no organismo. Dallé e Toni (2009) utilizaram o teste do micronúcleo para avaliação do potencial genotóxico de clareadores bucais caseiros e encontram alterações na função celular e fragmentação nuclear, mostrando que a utilização de substâncias genotóxicas é mais comum do que devia. No seu estudo, Crespo et al. (2009) observaram alterações no DNA de células expostas a um fotoprotetor utilizado frequentemente por várias pessoas a partir da indução de micronúcleos, o que aumenta ainda mais a importância do uso do teste do micronúcleo.

O teste do micronúcleo é uma alternativa bastante viável no estudo de danos no DNA e em cromossomos, pois permite a identificação clara das alterações provocadas pela exposição a agentes genotóxicos. Possui como principais vantagens o fato de ser de simples e fácil execução, fornece resultados rápidos e precisos, pode ser utilizado na classificação de diversos agentes, tanto de origem, química ou biológica. Mas, como em todos os testes, esse também apresenta algumas limitações. Existem agentes genotóxicos que não induzem a formação de micronúcleos, portanto, nem todos os estudos que dão negativos para micronúcleos significam que o agente testado não é mutagênico. Mesmo assim, a metodologia do micronúcleo é uma ótima alternativa para a detecção de danos em DNA e em cromossomos.

5.2.3 Teste Cometa

O ensaio do cometa é uma metodologia simples e eficaz, e se tornou um dos testes mais utilizados na detecção e quantificação de danos em DNA e em cromossomos, por ser capaz de identificar as lesões antes de elas ocorrerem. Foi desenvolvida inicialmente para testar a genotoxicidade da radiação em células, porém, com o passar do tempo, passou a ser utilizada também no estudo dos mecanismos de reparo em células individuais.

O teste Cometa é uma técnica de análise de danos em DNA e cromossomos abrangente, e que pode utilizar qualquer tipo celular. Existem diversos estudos sobre genotoxicidade de diversos compostos. A tabela 3 demonstra as principais aplicações desse teste.

Tabela 3. Número de publicações sobre estudos utilizando o ensaio do cometa, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos estudados.

TIPO DE ESTUDO	AGENTE ESTUDADO	NÚMERO DE PUBLICAÇÕES
Monitoramento ambiental	Efluentes domésticos/industriais, lixo, poluição	9
Estresse oxidativo	Exercício físico, cigarros, bebidas alcóolicas	12
Toxicidade de Agrotóxicos	Nanopartículas Pesticidas, herbicidas,	5
Toxicidade da radiação	Radiação UV, computadores, micro-ondas	4

O teste cometa tem sido muito empregado no biomonitoramento ambiental. Em um estudo feito por Valverde e Rojas (2009), o ensaio do cometa é apontado como a principal técnica de estudo para análise das condições ambientais, pois permite avaliar o dano diretamente nas populações expostas, portanto muito empregado para testes *in vivo*. A dificuldade encontrada na utilização do ensaio do cometa *in vivo* é o fato de muitas vezes não se ter o conhecimento do agente causador de danos no material genético. Nigro et al. (2009) detectou a presença de agentes genotóxicos em ambientes aquáticos utilizando-se o ensaio do cometa em células de diversas espécies sentinelas de água doce e salgada. Kolarević et al. (2013) observaram danos no DNA hemócitos do mexilhão de água doce *Sinanodonta woodiana* em um rio poluído, e obtiveram resultados valiosos que demonstram a eficiência do teste cometa para o biomonitoramento ambiental. É importante salientar que em estudos como

os apresentados acima, o teste foi utilizado apenas para fornecer dados para a tomada de medidas de combate a poluição de ambientes aquáticos, e que os agentes genotóxicos causadores das lesões no DNA não foram identificados.

Manzano e colaboradores (2015) avaliaram os riscos provocados pela utilização de água contaminada com efluentes domésticos e industriais pelo ensaio do cometa, e detectaram que a população estava exposta a agentes genotóxicos nos períodos de chuva, que é quando o rio está cheio e a água pode ser usada para diversos fins, desde lavagem de roupas, consumo e preparo de alimentos. Na época de seca não houve resultados positivos para genotoxicidade, devido o fato de nessa época, a população ribeirinha faz uso de água comprada.

Reichhold et al. (2009) utilizaram o teste do cometa para analisar a ação de exercícios de resistência na instabilidade do DNA e aparecimento de lesões, e detectaram que a prática de exercícios de resistência pode gerar aumento no estresse oxidativo e aparecimento de danos no DNA. O estudo de Akimoto e colaboradores (2010) explica que o exercício intenso eleva o número espécies reativas que levam a diminuição da proteção contra o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo também pode ser provocado pela exposição a nanopartículas. Sharma et al. (2019) estudaram o efeito de nanopartículas de óxido de zinco em células hepáticas humanas e detectaram o aparecimento de danos no DNA, devido a produção de espécies reativas de oxigênio. Outra nanopartícula muito estudada com o teste cometa é o dióxido de titânio, muito utilizado na indústria de cosméticos. Trouiller et al. (2009), Woodruff et al. (2012), Naya et al (2012) e Chen et al. (2014) demonstraram que a exposição prolongada ao dióxido de titânio pode levar a indução do estresse oxidativo das células devido o aparecimento de espécies reativas, o que pode provocar lesões a nível de DNA.

Marinowic e colaboradores (2011) estudaram a ação genotóxica do pesticida Piretróide β -Ciflutrina em células de peixe e comprovaram o potencial mutagênico desse composto, devido a formação de “cometas” nas células, além da morte de alguns peixes. Silva et al. (2013) estudaram a letalidade do FOLISUPER 600BR sobre girinos da espécie *physalaemus cuvieri* e observaram a indução de danos no DNA, que provocava a morte precoce dos girinos. Estudos como estes são importantes, pois mostram que substâncias comuns podem apresentar perigo para todos.

Wang et al. (2013) avaliaram a eficiência do teste cometa na detecção de danos provocados pela radiação ionizante e detectaram a quebra de fitas duplas do DNA pela

observação dos “cometas” formados. Garaj-Vrhovac & Oreščanin (2009) observaram as lesões formadas no DNA de leucócitos expostos a radiação micro-ondas. Eles observaram que aumento na cauda dos cometas variou de acordo com o tempo de exposição. Esse último trabalho é interessante porque as micro-ondas estão presentes no dia a dia da população, que muitas vezes utiliza dessa radiação para esquentar alimentos. Não se sabe bem os efeitos do consumo de expostos as micro-ondas, mas estudos como esse dão subsídios para pesquisas sobre o tema.

5.2.4 Teste de Ames

O teste de Ames, também chamado de ensaio de reversão de mutação em *Salmonella typhimurium*, Teste de *Salmonella* ou Ensaio do Microsoma é uma metodologia simples, utilizada para avaliar os danos em DNA causados por substâncias genotóxicas.

As linhagens de *S. typhimurium* modificadas geneticamente para se tornarem sensíveis a substâncias genotóxicas, a partir de mutações nos genes responsáveis pela síntese da histidina. Cada linhagem possui sensibilidade para identificar determinados tipos de mutações, aumentando a variedade de agentes que podem ser estudados. Na presença de determinadas substâncias, essas bactérias conseguem reverter seu caráter auxotrófico e passam a formar colônias, mesmo sem a presença da histidina.

O teste de Ames é uma técnica utilizada na detecção de mutações provocadas por substâncias químicas, agentes físicos como a radiação, para o monitoramento das condições ambientais, entre outros. Na tabela 4, pode ser observada as principais aplicações do teste de Ames, de acordo com o número de estudos encontrados.

Tabela 4. Número de publicações sobre estudos utilizando o teste de Ames, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos estudados.

TIPO DE ESTUDO	AGENTE ESTUDADO	NÚMERO DE PUBLICAÇÕES
Toxicidade de nanopartículas	Dióxido de titânio, óxido de alumínio, zinco solúvel	10
Toxicidade de Plantas	Óleos essenciais, flavonoides	10
Toxicidade de Agrotóxicos	Pesticidas	4
Monitoramento ambiental	Poluição de água	1

Yang e colaboradores (2011) estudaram a genotoxicidade de nanopartículas de prata e observaram que esse agente não provocava mutações nas bactérias. O mesmo autor em 2012 avaliou o potencial mutagênico do dióxido de titânio e obteve os mesmos resultados que o estudo anterior, chegando à conclusão de que o teste de Ames não é eficiente na análise da mutagenicidade das nanopartículas. Segundo Kumar et al. (2011) as nanopartículas não são capazes de provocar mutações nos genes do operon da histidina em *S. typhimurium*, por isso os resultados são comumente negativos, mas isso não significa que as nanopartículas não afetem o DNA. Por isso é importante sempre utilizar o teste de Ames associado a outros testes de genotoxicidade. Pan et al. (2009) adaptou a metodologia de Ames, escolhendo linhagens de *Escherichia coli* para realização do teste, e obteve resultados positivos em relação a genotoxicidade de nanopartículas de óxidos metálicos.

Resende e colaboradores (2012) estudaram a ação de flavonoides e detectaram a genotoxicidade dos tipos kaempferol, galangina e quercetina, em diferentes concentrações. Esses flavonoides são muito utilizados pela população no tratamento de algumas doenças, podem ser biotransformados em compostos tóxicos ao corpo, promovendo ação contrária a esperada. Ghazali et al. (2011) ao analisarem o potencial mutagênico do extrato de *Mitragyna speciosa* perceberam que essa espécie provocava um efeito contrário, que era a capacidade de anular os efeitos genotóxicos de outras substâncias. Esse trabalho mostrou-se significativo, pois comprova que a utilização do teste de Ames vai além do que testar a genotoxicidade de diversos compostos, como também de validar a atividade antimutagênica de substâncias.

Zhao et al. (2009) observaram o potencial mutagênico de pesticidas organoclorados a partir de mutações do tipo *frameshift* em estirpes de *S. typhimurium*. Liman et al. (2010) comprovou a ação do pesticida metolcarbo.

O teste de Ames possui uma metodologia simples, e fácil de ser adaptada de acordo com o tipo de agente a ser estudado. Outra vantagem é não necessita de células para a análise, pois se utiliza diretamente de linhagens específicas da bactéria *S. typhimurium*.

5.2.5 Teste de aberrações Cromossômicas

O teste de aberrações cromossômicas, também chamado de teste de avaliação cromossômica consiste na visualização de mutações estruturais ou numéricas, que ocorrem

devido a influência de diversos fatores, incluindo agentes genotóxicos. O aumento na frequência de aberrações cromossômicas em células é utilizado como indicador de genotoxicidade, uma vez que as ACs ocorrem em taxas muito raras naturalmente.

As alterações cromossômicas podem ser observadas em células metafásicas, a partir da visualização do cariótipo. A tabela 5 mostra os principais estudos encontrados utilizando o teste de ACs.

Tabela 5. Número de publicações sobre estudos utilizando o teste de aberrações cromossômicas, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos estudados.

TIPO DE ESTUDO	AGENTE ESTUDADO	NÚMERO DE PUBLICAÇÕES
Toxicidade de plantas	Extrato de plantas	5
Toxicidade de combustíveis	Gasolina, Btex	5

Pinho et al. (2010) estudaram a ação mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* e observaram alterações como separação das cromátides-irmãs, provocando alterações estruturais e numéricas e aumento no índice mitótico, comprovando a eficácia do teste de ACs. Sulczewski et al. (2014) analisou a atividade genotóxica de avenca e observou 8 quebras cromossômicas em diferentes concentrações testadas. Outras alterações como as metanucleares foram encontradas nos núcleos interfásicos das células foram observadas, mostrando que a técnica de ACs podem ser utilizadas na identificação de danos em nível cromossômicos.

Existem diversos estudo na literatura sobre a utilização do teste de ACs, mas que em sua grande maioria estão antes do período escolhido para realização deste trabalho. Quando se trata de trabalhos sobre alterações no DNA e cromossomos provocadas pela exposição a combustíveis, todos os trabalhos encontrados relatavam apenas um levantamento bibliográfico de estudos. Segundo Valente et al. (2017) isso aconteceu devido o fato de que para avaliação do potencial genotóxico dos combustíveis, não é necessário a análise do sangue periférico, apenas das células da mucosa oral, por isso a utilização dos testes de aberrações cromossômicas tiveram seu uso diminuído. Murata et al. (2017) observou o aparecimento de vários tipos de aberrações cromossômicas, como cromossomos em anéis, quebras e união das cromátides-irmãs em células de trabalhadores de postos de gasolina, demonstrando que a exposição ocupacional dessas pessoas a esse agente podem provocar danos no DNA e em Cromossomos.

5.2.6 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente permite a visualização de sequências de DNA específicas a partir da utilização de sondas marcadas. Recentemente passou a ser utilizada também na detecção de alterações cromossômicas, do tipo numéricas ou estruturais, permitindo a localização exata da região onde ocorreu a mutação.

A técnica de FISH pode ser utilizada na identificação de cromossomopatias, geradas a partir da exposição a substâncias genotóxicas ou de maneira natural. É também utilizada na análise de diversos tipos de cânceres. Na tabela 6, é possível observar os estudos encontrados utilizando a técnica de FISH e suas aplicações.

Tabela 6. Número de publicações sobre estudos utilizando a hibridização *in situ* fluorescente, relacionando com o tipo de agentes genotóxicos estudados.

TIPO DE ESTUDO	AGENTE ESTUDADO	NÚMERO DE PUBLICAÇÕES
Toxicidade de plantas	Extrato de plantas	4
Toxicidade de agrotóxicos	Inseticidas, Pesticidas	5
Toxicidade de Fármacos	droga antimalárica,	4
Toxicidade de Combustíveis	Gasolina, Btex, etanol	4
Toxicidade de Radiação	Radiação UV, ionizante	3

Morales (2012) avaliou o potencial genotóxico do herbicida sulfentrazone e o inseticida imidaclopride e encontrou diversas alterações, como fragmentações cromossômicas e pontes cromossômicas, em todas as concentrações testadas, provando assim a atividade clastogênicas desse composto. Esse estudo corrobora com o feito por Batista e Silva (2014) que estudaram os danos no DNA provocados pela exposição ocupacional a agrotóxicos em trabalhadores rurais, e observaram a presença de translocações cromossômicas e polimorfismos genéticos, demonstrando que o contato prologando com os agrotóxicos podem causar lesões no DNA e o conseqüente aparecimento de doenças.

A hibridização *in situ* Fluorescente é uma técnica promissora na análise de danos em DNA e cromossomos, devido a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez. Contudo, é uma técnica que exige o uso de equipamentos caros, como as sondas e reagentes, não sendo acessível a todo pesquisador.

5.2.7 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O teste SMART é utilizado no estudo de perda da heterozigosidade provocados por mutações ou recombinações gênicas. A partir da observação dos fenótipos das asas de *Drosophila melanogaster*, é possível identificar a presença de genes marcadores que demonstram a ocorrência de mutações ou recombinações.

Os estudos utilizando o teste SMART em *Drosophila melanogaster* são extensos na literatura, A tabela7 mostra os estudos encontrados utilizando esse teste, e quais agentes foram testados.

Tabela 7. Número de publicações sobre estudos utilizando o teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) relacionando com o tipo de agentes genotóxicos estudados.

TIPO DE ESTUDO	AGENTE ESTUDADO	NÚMERO DE PUBLICAÇÕES
Toxicidade de plantas	Extrato de plantas	9
Toxicidade de Fármacos	Antibacterianos, Orlistate,	6
Toxicidade de nanopartículas	-	4
Toxicidade de Agrotóxicos	Inseticidas, pesticidas	6

O teste SMART é muito utilizado na observação de mutações geradas por compostos de origem química, devido a fácil identificação do fenótipo mutante. Ribeiro e colaboradores (2009) estudaram a ação do extrato de *Solanum paniculatum* em células somáticas de *D. melanogaster* e observaram um aumento significativo nas manchas das asas que pode indicar a presença de mutações ou recombinações provocadas pela exposição ao extrato da planta. Orsolin e Nepomuceno (2009) estudaram o potencial mutagênico do açafrão e observaram o aparecimento de diversos tumores, localizados em várias regiões corporais de *D. melanogaster*, além de alterações no fenótipo das asas, que é o principal indício de que ocorreu lesão no material genético.

Silva e colaboradores (2014) observaram danos genéticos em todas as concentrações testadas do fármaco Cisplatina, que é muito utilizado no tratamento de câncer. É notável que alguns medicamentos utilizados em tratamento de neoplasias provoquem alterações genéticas irreversíveis. O mesmo observou Abreu et al. (2011) que comprovou a ação genotóxica do

antibiótico Ciprofloxacina, a partir da visualização de manchas nas asas de *D. melanogaster*, em todas as concentrações testadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de técnicas genéticas para a análise de danos em DNA e cromossomos possibilitam a identificação de uma ampla variedade de lesões genômicas e mutações. O crescente aumento na utilização dessas técnicas pode ser explicado pelo aumento no número de agentes potencialmente genotóxicos pelo qual a população encontra-se exposta.

Essa exposição muitas vezes é ocupacional, ou seja, muitos trabalhadores estão em contato diariamente com diversas substâncias químicas que podem gerar alterações no DNA e levar o aparecimento de doenças, por isso a preocupação em utilizar metodologias que identifiquem esses agentes e os danos provocados por eles, para que seja possível a criação de medidas para a prevenção e diminuição a essa exposição.

Todos os testes estudados, com exceção da técnica de FISH podem ser utilizados no biomonitoramento ambiental, a partir da observação e análise dos organismos existentes na região. Outra característica dos testes genéticos é a possibilidade de avaliação tanto do potencial mutagênico, quanto antimutagênico de diversas substâncias, podendo ser usados como ferramenta de avaliação da diminuição ou aumento do dano ao DNA e cromossomos.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, B.; THOMÉ, S.; LEHMAN, M.; DIHL, R. **Investigação da atividade mutagênica de dois agentes antibacterianos em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Revista de Iniciação Científica da ULBRA v.9.p.69-76. 2011.
- AKIMOTO, KA.; MIRANDA-VILELA, AL.;ALVES, PC.;PEREIRA.; LORDELO, GS.; HIRAGI, C.; SILVA, IC.; GRISOLIA, CK.; KLAUTAU, N. **Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage**. Free Radic Res. v.44, p.3, p.22-31, Mar. 2010.
- AKINBORO, A.; MOHAMED, KB.; ASMAWI, MZ.; OTHMAN, AS.; YING, TH.; MAIDIN, SM. **Mutagenic and antimutagenic assessment of methanol leaf extract of *Myristica fragrans* (Houtt.) using in vitro and in vivo genetic assays**. Drug Chem Toxicol. v.35, n.4, p.1–11, Oct. 2012.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, R.; K.; P. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALIMBA G.; BAKARE A. **In vivo micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats**. Ecotoxicology. v.25, p.310–319. 2016.
- ALKHZOUZ, C.; LAZEA, C.; BUCERZAN, S.; NASCU, I.; KISS, E.; DENES, CL.; GRIGORESCU-SIDO, P. **Clinical and Genetic Characteristics of Romanian Patients with Mucopolysaccharidosis Type II**. JIMD Reports v. 33, p. 19-25. 2016.
- ALVES, G.; OLIVEIRA, A.; MORAES, E.; CARDOSO, J **Efeitos da idade sobre as frequências de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas**. Revista. Bras. Geriatr. Gerontol., Rio de Janeiro. v.19, n.4, p. 627-634. 2016.
- ALVIM, L. B.; KUMMROW, BEIJO, F.; LIMA, A.; BARBOSA, S. **Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L.** Ambi-Agua, Taubaté, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011.
- AMAYA, A.; COLLINS, A. **The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair**. Archives of Toxicology. v.87, n.6 , p. 949–968. Jun. 2013.
- AMORIM, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev. Bras. Epidemiol.** São Paulo, v.6, n.2, p.158-170. 2003.
- AN, G.; LI, Z.; TAI, Y.; ACHARYA, C.; LI, Q.; QIN, X.; YI, S.; XU, Y.; FENG, X.; LI, C.; ZHAO, J.; SHI, L.; ZANG, M.; DENG, S.; SUI, W.; HAO, M.; ZOU, D.; ZHAO, Y. QI, J.; CHENG, T.; RU, K.; WANG, J.; ANDERSON. K.; QIU, L. **The impact of clone size on the prognostic value of chromosome aberrations by fluorescence *in situ* hybridization in multiple myeloma**. Clin Cancer Res. v.1 n.21, May. 2015.

- ANDRADE, Jade D'Antônio Navarro; SANTOS, Jaqueline Rosi Serqueira; Desirrê NASCIMENTO, Karoline Oliveira dos Santos; LIMA, Juliana Medeiros; HOWARD, Patrícia Monique Groba Smith; ROSÁRIO, Rafaela Conceição Pereira; LOBO, Vitória Politano; BARBOSA, Frederico Kauffmann. **Erros Cromossômicos Relacionados aos Cromossômicos Sexuais**. Unilus, São Paulo, v.13, n.30, p. 124. Out. 2015.
- ANDRADE, L. **Resposta a danos no DNA após exposição à luz ultravioleta: apagando o fogo antes do incêndio celular**. Revista da Biologia, v.14, n.1, p. 6-16. 2015.
- ANDRADE, L.R.; BRITO, A.R.; MELERO, A. **Absence of mutagenic and recombinogenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot test and *Allium cepa* test**. Ecotoxicology and Environmental Safety. v.99, p.92–97. 2014.
- ANGELIERI, F.; FRANCHI, L.; CEVIDANES, LHS.; SCANAVINI MA, MCNAMARA-JR JA. **Long-term treatment effects of the FR-2 appliance: a prospective evaluation 7 years post-treatment**. Eur J Orthod, v.36, p.192–199. 2014.
- AQUINO, R.; VASQUES, P.; CAVALCANTE.; OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, B.; PINHEIRO, L. **Carcinoma Ductal Invasor: Relação de Características Anatomopatológicas Com a Presença de Metástases Axilares em 220 Casos**. Rev. Col. Bras. Cir., v.44, n.2, p.163-170, Abr. 2017.
- ARALDI, R.; MELO, T.; MENDES, T.; SÁ, P.; NOZIMA, B.; ITO, E.; CARVALHO, R.; SOUZA, E.; CASSIA, R. **Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review**. Biomed Pharmacother. v.72, p.74-82. May. 2015.
- ARCY, A.; SILVA, M.; CUNHA, T. **Testes ecotoxicológicos de diferentes formulações do bioinseticida produzido na UNIVILLE submetidas ao teste de prateleira**. Eng. Sanit. Ambient., Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 435-440, Dec. 2014.
- ARRAES, A.; LONGHIN, S. **OTIMIZAÇÃO DE ENSAIO DE TOXICIDADE UTILIZANDO O BIOINDICADOR *Allium cepa* COMO ORGANISMO TESTE**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. – 2012.
- ASARE, GA.; BUGYEI, K.; SITTE, A.; YAHAYA, ES.; GYAN, B.; ADJEI, S.; ADDO, P.; WIREDU, EK.; ADJEI, DN.; NYARKO, AK. **Genotoxicity, cytotoxicity and toxicological evaluation of whole plant extracts of the medicinal plant *Phyllanthus niruri* (Phyllanthaceae)**. Genet Mol 11: 100-111. January, 2012.
- ASARE, N, INSTANES, C.; SANDBERG, WJ.; REFSNES, M.; SCHWARZE, P.; KRUSZEWSKI, M.; BRUNBORG, G. **Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells**. Toxicology. Jan 27; v.29, n.1p.65-72. 2012
- AVIV, A.; HUNT, SC.; LIN, J.; CAO, X.; KIMURA, M.; BLACKBURN, E. **Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR**. Nucleic Acids Res. v.39, n.20 p.134. Nov. 2011.

BALLESTRERI, E. **Teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional a pesticidas: revisão.** Revinter, v. 10, n. 01, p. 19-28, fev. 2017.

BARANAUSKAS V. **Absence of mutagenic and recombinagenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot test and *Allium cepa* test.** Ecotoxicol. Environ. Saf.; v.99: p.92–97. 2014.

BARCELOS, V. M.; PIRES, A.; BRESOLIN, S. **Efeito mutagênico da azida sódica na cultivar de arroz irga 409.** Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, Rio Grande do Sul, v.2, p. 5–10, 2018.

BATISTA, M.; SILVA, D. **Avaliação citogenética e molecular de indivíduos ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos.** Dissertação. (Mestrado em Genética::Genética Molecular e de Microrganismos). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2014.

BATISTA-GALLEP, T.; PASQUOTO-STIGLIANI, T.; GUILGER, M.; TORRES, D.; GERMANO-COSTA, T.; BILESKY-JOSÉ, N.; FRACETO, L.; CARVALHO, C.; LIMA, R. **Efeitos de Nanopartículas Comerciais de Óxido de Ferro (Fe₂O₃): Citotoxicidade, Genotoxicidade e Estresse Oxidativo.** Quím. Nova, São Paulo, v. 41, n. 9, p. 974-981, Set. 2018.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. D. C. P. **Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal.** Natureza on line, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BENVINDO-SOUZA, M.; ASSIS, RA.; OLIVEIRA, EAS.; BORGES, RE.; SANTOS, LRS. **The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions.** Environ Sci Pollut Res Int. v.24, n.36,p.27724-27730 Dec, 2017.

BERG, K.; BISCHOFF, R.; STEGMÜLLER, S.; CARTUS, A.; SCHRENK, D. **Comparative investigation of the mutagenicity of propenyllic and allylic asarone isomers in the Ames fluctuation assay.** Mutagenesis, v.31, n.4, p. 443–451, July. 2016.

BIANCHI, E. Goldoni A, Trintinaglia L, Lessing G, Silva CEM, Nascimento CA. **Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil.** Braz. J. Biol., São Carlos, v. 75, n. 2, supl. p. 68-74, May. 2015 .

BISHOP, R. **Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance.** Biosci Horiz. v.3, n.1, p.85-95. 2010

BOHGAKI, T.; BOHGAKI, M.; HAKEM, R. **DNA double-strand break signaling and human disorders.** Genome integrity, v. 1, n. 1, p. 15, 2010.

BOLOGNESI, C.; BONASSI, S.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M.; BRUZZONE, M.; LANDO, C.; CEPPI, M. **Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis.** Rev. Mutat Res. v. 766, p. 20-31, Oct.–Dec. 2015.

BOLOGNESI, C.; BRUZZONE, M.; CEPPI, M.; KIRSCH-VOLDERS, M. **The lymphocyte cytokinesis block micronucleus test in human populations occupationally exposed to vinyl chloride: A systematic review and meta-analysis.** *Mutat Res.* v.774, p.1-11. Oct. 2017.

BRENERMAN, B. M.; ILLUZZI, J. L.; WILSON III, D. M. **Base excision repair capacity in informing healthspan.** *Carcinogenesis*, v. 35, n. 12, p. 2643-2652, 2014.

BRUCE, Alberts e col. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.

CARBAJAL-LÓPEZ, Y., GÓMEZ-ARROYO, S., VILLALOBOS-PIETRINI, R. CALDERÓN-SEGURA, M.; MARTÍNEZ-ARROYO, A. **Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test.** *Environ Sci Pollut Res.* v.23, p.2513–2520. 2016.

CARVALHO L.; BRITTO, F.; MARIN-MORALES, M.; MAFFEI1, E. **Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo.** *Revista da Biologia.* v.17, n.1, p.1-5. 2017.

CARVALHO, T.; MIUCCI, M.; FROES, G.; OLIVEIRA, C. SANTOS, S. **Testes Para Avaliação De Genotoxicidade Com *Allium Cepa*: Estado Da Arte.** *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento.* v. 3, p. 131-139 Dez. 2018.

CERVENA, T.; ROSSNEROVA, A.; SIKOROVA, J.; BERANEK, V.; VOJTISEK-LOM, M.; CIGANEK, M.; TOPINKA, J.; ROSSNER, P. **DNA Damage Potential of Engine Emissions Measured In Vitro by Micronucleus Test in Human Bronchial Epithelial Cells.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* v.121, n.3, p.102-108, Sep. 2017.

CHAUFFAILLE, M. **Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São Paulo* , v. 32, n. 4, p. 308-316. 2010.

CHEN, T.; YAN, J.; YAN, LI. **Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles.** *Journal of Food and Drug Analysis* v.22, n.1, p 95-104. March 2014.

CHUNG, MJ.; LIN, W.; DONG L.; LI, X. **Tissue requirements and DNA quality control for clinical targeted next-generation sequencing of formalin-fixed, paraffin-embedded samples: a mini-review of practical issues.** *J Mol Genet Med.* v. 11 n. 2. 2017.

CIAPPINA, A.; FERREIRA, F.; PEREIRA, I.; SOUSA, T.; MATOS, F.; MELO-REIS, P.; GONÇALVES, P.; BAILÃO, E.; ALMEIDA, L. **Oxicity of *Jatropha Curcas L.* LATEX IN *Allium cepa* TEST.** *Biosci. J, Uberlândia,* v. 33, n. 5, p. 1295-1304, Sept./Oct. 2017.

CLAXTON, LD.; UMBUZEIRO, A.; DEMARINI, DM. **The *Salmonella* mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century.** *Environ Health Perspect.* v.118, n.11, p.1515-22. Nov. 2010.

COLLINS, A. **Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* v. 1840, n.2, p. 794-800 Feb. 2014.

COSTA, S.; TEIXEIRA, JP. **Comet Assay.** *Encyclopedia of Toxicology* p. 1020-1023. 2014.

CRESPO, N.; NAKAMURA, C.; SIRAICHI, J. **Avaliação da genotoxicidade da formulação de um fotoprotetor.** CESUMAR. 2009.

DALLÉ, H.; TONI, A. **Investigação do potencial genotóxico do clareador caseiro (peróxido de carbamida a 15%) na mucosa bucal utilizando o teste de micronúcleo.** MONOGRAFIA. (Trabalhos de Conclusão de Curso em Odontologia). Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DALZUCHIO, T., GOLDONI, A., ZIMMERMANN PRADO RODRIGUES, G., PETRY, I., BASSO DA SILVA, L., & GEHLEN, G. **Histopatologia de brânquias e teste de micronúcleos em *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) na avaliação dos efeitos causados pela exposição aguda ao alumínio.** Biotemas, Florianópolis, v. 29, n. 1, p. 75-83, fev. 2016.

DIAS, DA.; URBAN, S. ROESSNER.; UA. **Historical Overview of Natural Products in Drug.** Metabolites. v.2, p.303-336. 2012.

DIXON, JR.; JUNG, I.; SELVARAJ, S.; SHEN, Y.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, JE.; LEE, AY.; YE, Z.; KIM, A.; RAJAGOPAL, N.; XIE, W.; DIAO, Y., LIANG, J., ZHAO, H., LOBANENKOV, VV, ECKER, JR, THOMSON, JA, REN, B. **Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation.** Nature, V. 518, N.7539, p. 331 – 336. Feb. 2015.

DÜSMAN, Elisângela; BERTI, Alessandra Paim; SOARES, Lilian Capelari; VICENTINI Veronica Elisa Pimenta. Principais Agentes Mutagênicos e Carcinogênicos de Exposição Humana. **SaBios: Saúde e Biologia**, Maringá, v.7, n.2, p.66-81, mai./ago., 2012.

EMBRAPA. **O Papel das mutações na compreensão da genética do milho.** Sete Lagoas, 2010. 33p.

FAGGIOLI, F.; VIJG, J.; MONTAGNA, C. **Chromosomal aneuploidy in the aging brain.** Mech Ageing Dev. v.132, p.8-9, Aug. 2011.

FARIA, L.E.M.; BRAGA, J.R.M. **Aplicação do teste de micronúcleo para avaliação de potencial genotóxico em epitélio oral de estudantes universitários.** Revista Eletrônica Atualiza Saúde, n. 1., p. 36-41, 2015.

FEDATO RP, MAISTRO EL. **Absence of genotoxic effects of the coumarin derivative 4-methylesculetin in vivo and its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage.** J Appl Toxicol. v.34, p.33–39. 2014.

FERIGOLO, Paola Cristine; SAGRILLO, Michele Rorato. **Genotoxicidade relacionada ao consumo de chimarrão.** Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v.14, n.1, p.1-13, 2013.

FRANCIOLI, L.; POLAK, P.; KOREN, A.; MENELAOU, A.; CHUN, S.; RENKENS, I.; SUNYAEV, R. **Genome-wide patterns and properties of de novo mutations in humans.** Nature genetics, v.47 n.7, p. 822–826. 2015.

FRESCURA, V. D. S.; KHUN, A. W.; LAUGHIGHOUSE, I. V.; PARANHOS, J. T.; TEDESCO, S. B. **Post-treatment with plant extracts used in Brazilian folk medicine caused a partial reversal of the antiproliferative effect of glyphosate in the *Allium cepa*.** *Biocell, Mendoza*, v. 37, n. 2, p. 23-28, 2013.

FUKUI, K. **DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria.** *Journal of Nucleic Acids*, v. 2010, n. c, p. 1–16, 2010.

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva.** 3. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009.

GAIVÃO, I; SIERRA, L.M. **Drosophila comet assay: insights, uses, and future perspectives.** *Frontiers in Genetics*, v. 5, p. 304, 2014.

GALVÃO, Taís Freire; PEREIRA, Mauricio Gomes. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 183-184, mar. 2014.

GANEM, NJ.; PELLMAN, D. **Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage.** *J Cell Biol.* v.199, p.871–881. 2012.

GARAJ-VRHOVAC, V.; GAJSKI,G.; TROŠIČ, I. AND PAVICIC, I. **Leukocytes after exposure to microwave radiation.** *Toxicology*, v.259, p.107-112, 2009.

GAZALI, R.; RAJAB, N.; R, A.; RAMLI, N. **Mutagenic and antimutagenic activities of *Mitragyna speciosa* Korth extract using Ames test.** *Journal of medicinal plant research* v.5, n.8, April. 2011.

GLEI, T.; SCHLÖRMANN, W. **Comet assay: an essential tool in toxicological research.** *Archives of Toxicology*, v. 90, n. 10, p. 2315–2336. Octo. 2016.

GRIFFITHS, ANTHONY J. F.; LEWONTIN, RICHARD C.; CARROLL, SEAN B.; WESSLER, SUSAN R. **Introdução à Genética.** 11. Ed. São Paulo. Guanabara Koogan, 2016.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução.** Brasília: Editora UNB, 2005.

GROB, A.; MCSTAY, B. **Construction of synthetic nucleoli and what it tells us about propagation of sub-nuclear domains through cell division.** *Cell Cycle*, London. v.13, n. 16, p. 2501-2508 jul. 2014.

HALLARE, A., OCAMPO, K., TAYO P.; BALOLONG, M. **Genotoxic Stress Induced By Intensive Aquaculture Activities In Taal Lake (Philippines) On Circulating Fish Erythrocytes Using the Comet Assay and Micronucleus Test.** *Advances in Environmental Biology*, v.10, n.1, p.273-283. Jan. 2016.

HARA, R.; LOPES B.; SANTOS, F.; OLIVEIRA, R. **Aplicabilidade de ensaios da genética toxicológica no biomonitoramento de ambientes aquáticos e promoção da saúde**

humana. Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa, v. 25, n. 48-49, p. 20-25, set. 2018.

HARTL, L.; CLARK, G. **Princípios de Genética de Populações.** 4ª Edição. Porto Alegre: Artmed. 2010.

HAYASHI, M. **The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test.** Hayashi Genes and Environment 38:18, p. 2-6. 2016.

HENG, H.; LIU, G.; STEVENS, JB.; ABDALLAH, BY.; HORNE, SD.; YE, K.; BREMER S.; CHOWDHURY, SK.; YE, CJ. **Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities.** Cytogenet Genome Res.; v.3, n.57, p.139-144. 2013.

HERRERO, O.; PEREZ, JMM.; FERNÁNDEZ, PF. **Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test.** Mut. Res. v.743, p. 24-34. 2012.

HORI, H.; SHIMOYOSHI, S.; TANAKA, Y.; MOMONAMI, A.; MASUMURA, K.; YAMADA, M.; FUJII, W.; KITAGAWA, Y. **Integration of micronucleus tests with a gene mutation assay in F344 gpt delta transgenic rats using benzo[a]pyrene.** Mutat. Res. Gen. Tox. Em. v. 837 p. 1–7. 2019.

ILIAKIS, G.; MURMANN, T.; SONI, A. **Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations.** Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 793, p. 166-175, 2015.

JABLONKA E, LAMB MJ. **Evolução em quatro dimensões: DNA, comportamento e a história da vida.** São Paulo: Companhia das Letras; 2010.

JACOBS, L.; SCHÄR, P. **DNA glycosylases: In DNA repair and beyond.** Chromosoma, v. 121, n. 1, p. 1–20, 2012.

JAYAKUMAR, S.; PAL, D.; SANDUR, S. K. **Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells.** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 779, p. 33-45, 2015.

JOAQUIM, L.; EL-HANI, C. **A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene.** Scientiæ Studia, v.8, n.1, p.93-128. 2010.

JOAQUIM, Leyla Mariane; EL-HANI, Charbel Niño. **A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene.** **Sci. stud.**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 93-128, Mar. 2010.

KAMILERI, I.; KARAKASILIOTI, I.; GARINIS, A. **Nucleotide excision repair: New tricks with old bricks.** Trends in Genetics, v. 28, n. 11, p. 566–573, 2012.

KARLSSON, H.; DI BUCCHIANICO, S.; COLLINS, AR.; DUSINSKA, M. **Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity?** Environ Mol Mutagen. v.56, n.2, p.82-96. Mar. 2015.

KASPER, N.; BARCELOS, RP.; MATTOS, M.; BARONI, S. **Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test.** *Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science.* v.13, n.3, p.1-10. 2018.

KHERA, V.; CHAFFIN, M.; ARAGAM, G.; HAAS, M.; ROSELLI, C.; CHOI, S.; NATARAJAN, P.; LANDER, E.; LUBITZ, S.; ELLINOR, P.; KATHIRESAN, SEKAR. **Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations.** *Nature Genetics,* v. 50, p. 1219–1224. 2018.

KIREEVA, M. L.; KASHLEV, M.; BURTON, Z. F. **RNA polymerase structure, function, regulation, dynamics, fidelity, and roles in gene expression.** *Chemical reviews,* v. 113, n. 11, p. 8325-8330, 2013.

KLAUNING, J.; KAMENDULIS, L. ; HOCEVAR, B. **Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis.** *Toxicologic Pathology,* v.38, n.1, p. 96-109, 2010.

KLUG, F.; PRAKASH, H.; HUBER, PE.; SEIBEL, T.; BENDER, N.; HALAMA N.; PFIRSCHKE, C, VOSS, RH.; TIMKE, C.; UMANSKY, L.; KLAPPROTH, K.; SCHÄKEL, K.; GARBI, N.; JÄGER, D.; WEITZ, J.; SCHMITZ-WINNENTHAL, H.; HÄMMERLING, GJ.; BECKHOVE, P. **Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy.** *Cancer Cell.* V.24, n.5, p. 589-602 Nov, 2013.

KLUG, S.; CUMMINGS, R.; SPENCER, A.; PALLADINO, A. **Conceitos de Genética.** 9 edi. Porto alegre: Artmed, 2010.

KOKSAL M, GÜRBÜZEL M. **Analysis of genotoxic activity of ketamine and rocuronium bromide using the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*.** *Environmental Toxicology and Pharmacology.* v.39, p.628-634. 2015.

KOLAREVIC, J.; SELSET, R.; FELIP, O.; GOOD, C.; SNEKVIK, K.; TAKLE, H.; YTTEBORG, E.; BÆVERFJORD, G.; ÅSGÅRD, T.; TERJESEN, B. **Influence of long term ammonia exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr growth and welfare.** v.44, n.11, p. 1649-1664, Octo. 2013.

KONDOH, M.; OHGA, N.; AKIYAMA, K.; HIDA, Y.; MAISHI, N.; TOWFIK, A.; INOUE, N.; SHINDOH, M.; HIDA, K. **Hypoxia-induced reactive oxygen species cause chromosomal abnormalities in endothelial cells in the tumor microenvironment.** *PLoS One.* v.15, n.81. Nov. 2013.

KUMAR, V.G.; GOKAVARAPU, S.D.; RAJESWARI, A.; DHAS, T.S.; KARTHICK, V.; KAPADIA, Z.; SHRESTHA, T.; BARATHY, I.A.; ROY, A.; SINHA, S. **Facile green synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of antidiabetic potent *Cassia auriculata*.** *Colloids Surf. B Biointerfaces* 87, 159–163. 2011.

KUMARAVEL, T.S., VILHAR, B., FAUX, S.P. **Comet Assay measurements: A perspective.** *Cell Biol Toxicol* v.25, p.53–64. 2009.

- LACERDA, P.; MALAQUIAS, G.; PERON, A. **Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L.** An. Acad. Bras. Ciênc., Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1147-1150, Sept. 2014.
- LAMBERT, S.; CARR, A. **Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability.** Chromosoma. V. 122, n.2, p. 33–45 Mar, 2013.
- LANDAU, D. A.; SLACK, F. J. **MicroRNAs in mutagenesis, genomic instability, and DNA repair.** Seminars in oncology, v.38, n.6, p.743–751. 2011.
- LARRACUENTE, M.; PATRICK M. FERREE. **Simple Method for Fluorescence DNA *In Situ* Hybridization to Squashed Chromosomes J.** Vis. Exp. (95), e52288, doi:10.3791/52288 (2015).
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. ***Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application.** Mutation Research, n. 682, p. 71-81. 2009.
- LESSA, R. CARIELLO, R. **Adsorção do Paracetamol em Carvão Ativado: Regressão da Citotóxicidade e Mutagênicidade no Sistema *Allium Cepa*.** Revista Hórus, v. 12, n.1, p. 44-54, 2017.
- LEWIN, B. **Genes IX.** 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- LIAO, W.; MCNUTT, MA.; ZHU, WG. **The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells.** Methods. v.48, n.1, p.46-53, May. 2009.
- LIMA, L. C. A. **Respostas a danos no DNA envolvidas na recuperação do bloqueio da replicação e transcrição em células humanas.** São Paulo. Tese (Doutorado em Ciências, Instituto de Ciências Biológicas) - Universidade de São Paulo; 2014.
- LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. **Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and *Allium* test.** Chemosphere. v.80, n.9) Aug. 2010.
- LOMBARDOT, B.; OH, CT2.; KWAK, J.; GENOVESIO, A.; KANG, M.; HANSEN, MA.; HAN SJ. **High-throughput in vivo genotoxicity testing: an automated readout system for the somatic mutation and recombination test (SMART).** PLoS One. v.1, n. 10. Apr. 2015.
- LONDERO, M.; BENEDETTE, D.; ROHR, P.; ABREU, B.; SILVA, J. **Implementação do ensaio cometa com o uso de endonucleases de reparo para a detecção de bases oxidadas.** SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA (E-poster), 2013.
- LUCIO, Lorena M.C., BRAZ, Mariana G., NASCIMENTO JUNIOR, Paulo do, BRAZ, José Reinaldo C., & Braz, Leandro G. **Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos.** **Rev. Brasileira de Anestesiologia.**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 33-41, Feb. 2018.

- LYA, G.; SOETEMAN-HERNÁNDEZ.; G. JOHNSON, W. **Estimating the carcinogenic potency of chemicals from the *in vivo* micronucleus test.** *Mutagenesis*, v. 31, n.3, p. 347–358, May, 2016.
- MANZANO, BC.; ROBERTO, MM.; HOSHINA, MM.; MENEGÁRIO, AA. MARIN-MORALES, MA. **Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of Sao Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells.** *Environ Sci Pollut Res Int*, v. 22, p. 1399-407, 2015.
- MARINOWIC, DR.; MERGENER, M.; POLLO, TA.; MALUF, SW.; DA SILVA, LB. **In vivo genotoxicity of the pyrethroid pesticide beta-cyfluthrin using the comet assay in the fish *Bryconamericus iheringii*.** *Z Naturforsch C*. v.67 p.5-6, May-Jun. 2012.
- MATSUMURA, S.; ITO, Y.; MORITA, O.; HONDA, H. **Genome resequencing analysis of *Salmonella typhimurium* LT-2 strains TA98 and TA100 for the establishment of a next-generation sequencing-based mutagenicity assay.** *J Appl Toxicol*. v.37, n.9, p.1125-1128 Sep. 2017.
- MCCANN, A.; EISENHAUER, L. **Hereditary cancer syndromes with high risk of endometrial and ovarian cancer: Surgical options for personalized care.** *Journal of Surgical Oncology*, v. 111, n. 1, p. 118-124, 2014.
- MENCK, CF.; MUNFORD, V. **DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging?** *Genet. Mol. Biol.* v.37, n.1, p. 220-33 Mar, 2014.
- MENDES, S; SOUZA K.; JÚNIOR, C. **Teste do Micronúcleo em Células Exfoliativas da Mucosa Bucal Como Ferramenta da Biomonitoração Em Fumantes: Uma Revisão de Literatura.** *Ciências Biológicas e de Saúde Unit*. v. 4, n. 1, p. 53-64. Nov. 2018.
- MOHRIN, M.; BOURKE, E.; ALEXANDER, D.; WARR, MR.; BARRY-HOLSON, K.; LE BEAU, MM.; MORRISON, CG.; PASSEGUÉ, E. **Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis.** *Cell Stem Cell*. v.6, n.7, p.74-85. Aug. 2010.
- MORALES, M.; AMBRÓSIO, J. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de 2 classes de agrotóxicos utilizados em cultura de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo-Brasil. (TESE) (Doutorado em Biologia Celular e Molecular).** IBRC. São Paulo, p. 137. 2012.
- MORIO, T. **Recent advances in the study of immunodeficiency and DNA damage response.** *International journal of hematology*, v. 106, n. 3, p. 357-365, 2017.
- MORIWAKI, S. **Human DNA Repair Disorders in Dermatology: A Historical Perspective, Current Concepts and New Insight.** *Journal of Dermatological Science*, v. 81, n. 2, p. 77– 84, 2016.
- MORIWAKI, T.; GOSHIMA, G. **Five factors can reconstitute all three phases of microtubule polymerization dynamics.** *J Cell Biol*. v. 215, n.3, p. 357-368 Nov, 2016.

MORO, AM.; CHARÃO, MF.; BRUCKER, N.; DURGANTE, J.; BAIERLE, M.; BUBOLS, G. **Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants**. *Mutat Res.*; v.754 n.1-2, p. 63-70, jun. 2013.

MORO, AM.; CHARÃO, MF.; BRUCKER, N.; DURGANTE, J.; BAIERLE, M.; BUBOLS, G. **Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants**. *Mutat Res.* 2013; 754(1-2):63-70.

MORTELMANS, K. **A perspective on the development of the Ames Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity assay**. *Mutat Res.* v.841, p.14-16. May. 2019.

MOTA, G.; BARBONI, S.; JESUS, M. **Tilápias (*Actinopterygii: Cichlidae*) comercializadas em feira de santana (bahia) como bioindicadores de poluição ambiental em rios da bacia do Paraguaçu**. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba*, v. 19, p. 11-18, jan./dez. 2009

MUKHERJEE, D.; COATES, PJ.; LORIMORE, SA.; WRIGHT, EG. **The in vivo expression of radiation-induced chromosomal instability has an inflammatory mechanism**. *Radiat. Res.*, New York, v. 177, n. 1, p. 18-24, 2012.

MURATA, M.; COSTA-AMARAL, I.; CARVALHO, L.; SOUZA, G.; MAINENTI, H.; CARVALHO, M. **Alterações respiratórias, auditivas e citogenéticas em trabalhadores de um estaleiro no Rio de Janeiro: estudo de caso**. *Cad. saúde colet.* v.25, n.4, p.394-404. 2017.

NAASSE, Y.; CHAROUTE, H.; EL HOUATE, B.; ELBEKKAY, C.; RAZOKI, L.; MALKI, A.; BARAKAT, A.; ROUBA, H. **Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco**. *BMC Urology.* v.15, n.95, 2015.

NAI, G.; OLIVEIRA, M.; TAVARES, G.; PEREIRA, L.; SOARES, N.; SILVA, P. **Avaliação da genotoxicidade induzida pela administração repetida de anestésicos locais: um estudo experimental em ratos**. *Rev. Bras. Anesthesiol. Campinas*, v. 65, n. 1, p. 21-26, Feb. 2015 .

NAYA, M.; KOBAYASHI, N.; EMA, M.; KASAMOTO, S.; FUKUMURO, M.; TAKAMI, S.; NAKAJIMA, M.; HAYASHI, M.; NAKANISHI, J. **In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats**. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* v. 62, n.1, , p.1-6, February. 2012.

NEVES, E. S.; FERREIRA, P. M. P.; LIMA, L. H.; PERON, A. P. **Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L.(Euphorbiaceae) leaves on Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 3, p. 1131- 1136, 2014.

NEVES, E.; FERREIRA, P.; LIMA, L.; PERON, A. **Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L.** *An. Acad. Bras. Ciênc.* Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1131-1137, Sept. 2014 .

NEVES, N.; GUEDES, C. **Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária**. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.79, n.4, p.627-632, out./dez., 2012.

NIGRO, M.; FRENZILLI, G.; LYONS P. **The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments.** Mutation Research/Reviews in Mutation Research. v.681, n.1, p.80-92, January–February, 2009.

NUSSBAUM, R. L.; MCLNNES, R. R.; WILLARD, H. F. THOMPSON & THOMPSON: **Genética Médica.** 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

OLIVEIRA, LM.; VOLTOLINI, C, BARBÉRIO A. **Potencial mutagênico dos poluentes da água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*.** Revista Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science. v.6, n.1, p.190-103, 2011.

ORSOLIN, P. C.; NEPOMUCENO, J. C. **Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma longa* L.) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*.** Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM, v. 6, p. 55-69, 2009.

OZTURK, S.; DEMIR, N. **DNA repair mechanisms in mammalian germ cells.** Histology and histopathology, v. 26, n. 4, p. 505-517, 2011.

PAN, X.; REDDING, JE.; WILEY, PA.; WEN, L.; MCCONNELL, JS.; ZHANG, B. **Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay.** Chemosphere. v.79, n.1, Mar. 2010.

PAUMGARTTEN, F.; GOMES-CARNEIRO, M.; OLIVEIRA, A. **O impacto dos aditivos do tabaco na toxicidade da fumaça do cigarro: uma avaliação crítica dos estudos patrocinados pela indústria do fumo.** Cad. Saúde Pública vol.33 supl.3 Rio de Janeiro 2017.

PERKHULYN, V.; ROVENKO, B.; ZVARYCH, T.; LUSHCHAK, O.; STOREY, JM. **Sodium chromate demonstrates some insulin-mimetic properties in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.** Comparative Biochemistry and Physiology. V.167, p. 74–80. Sep. 2015.

PINHO, S.; STURBELLE T.; MARTINO-ROTH, M.; GARCIAS, L. **Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos.** Rev. bras. farmacogn., Curitiba , v. 20, n. 2, p. 165-170, May 2010.

PLOMIN, R.; De FRIES, J.C.; McCLEARN, G.E. & McGUFFIN, P. **Genética do Comportamento.** 5ª edição. Porto Alegre: Artimed, 2016.

PRESS, M. F.; SAUTER, G.; BUYSE, M.; FOURMANOIR, H.; QUINAUX, E.; TSAO-WEI, D.; SLAMON, D. **HER2 Gene Amplification Testing by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH): Comparison of the ASCO-College of American Pathologists Guidelines With FISH Scores Used for Enrollment in Breast Cancer International Research Group Clinical Trials.** Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, v.34, n.29, p.3518–3528. 2016.

RADIĆ, S.; STIPANICEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M.; SIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. **The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test.** Sci Total Environ. v. 408, n. 5, p. 1228-1233, fev. 2010.

RAND, M. D. **Drosophotoxicology: the growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology.** Neurotoxicology and Teratology, v. 32, p. 74-83, 2010.

RATAN, ZA.; ZAMAN, SB.; MEHTA, V.; HAIDERE, MF.; RUNA, NJ.; AKTER, N. **Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science.** Cureus. v.9, n.6, p.1325. Jun. 2017.

REDDY, U.; PAGE, G.; SAADE, G.; SILVER, R.; THORSTEN, V.; PARKER, C.; PINAR, H.; WILLINGER, M.; STOLL, B.; HEIM-HALL, J.; VARNER, MW.; GOLDENBERG, RL.; BUKOWSKIR, W.; DREWS-BOTSCH, C.; O'BRIEN, B.; DUDLEY, DJ.; LEVY, B.; **Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth.** N Engl J Med. v.6, n.23, Dec. 2012

REGO, C. **Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade da dipirona sódica e do paracetamol em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*.** Boletim Informativo Geum, v. 6, n. 4, p. 7-15, out./dez. 2015.

REICHHOLD S.; NEUBAUER, O.; BULMER, CA.; KNASMÜLLER, S.; WAGNER, K. **Endurance exercise and DNA stability: Is there a link to duration and intensity?** Mutation Research/Reviews in Mutation Research. v.682, n.1, p.28-38, Jul–Aug. 2009.

REIS, A.; DA SILVA, C.; BORGES, C. **Análise das Dificuldades dos Alunos Acerca das Cromossomopatias: Uma Abordagem Baseada na Metodologia da Teoria Fundamentada.** Revista Areté / Revista Amazônica de Ensino de Ciências, v. 9, n. 19, p. 239-253, maio 2017.

RENKAWITZ, J.; LADEMANN, A.; JENTSCH, S. **Mechanisms and principles of homology search during recombination.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 15, n. 6, p. 369–383, 2014.

RESENDE FR, CAMPOS DL, SILVA VC, DE GRANDIS RA, SOUZA LP, JUNIOR CSL. **Mutagenicity and chemopreventive activities of *Astronium* species assessed by Ames test.** Regul. Toxicol. Pharmacol. v.72, p.506–513, 2015.

RESENDE, F.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.; VARANDA E. **Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test.** Molecules. v..17, n.5, p.55-68. 2012. ·

RIBEIRO, J.; OLIVEIRA, R.; MAIA, A.; PIRES, L.; SOUSA J.; HEREDIA, F.; MAGALHÃES, S.; PINHEIRO, R. **Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome.** Hematological oncology, v. 33, n. 4, p. 220-228, 2015.

RIBEIRO, L.R.; SALVADOR, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental.** Editora Ulbra. Canoas: 1o ed., 2003

RIBEIRO, T. P.; SOUSA, T. R.; ARRUDA, A. S.; PEIXOTO, N.; GONCALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M . **Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa***

latex in *Allium cepa* root model. Brazilian Journal of Biology, São Carlos, v. 76, p. 245-249, 2016.

RIBEIRO, V.; VIEIRA, I.L.B.F.; PASSOS, D.C.S.; SILVA, E.M.; VALE, C.R.; FELÍCIO, L.P.; FERREIRA, H.D.; VIEIRA, P.M.; CARVALHO, S. **Ausência de mutagenicidade de *Solanum paniculatum* L. em células somáticas de *Drosophila melanogaster*: SMART/asa.** Revista Biologia Neotropical, v. 6, n. 2, p. 27-33, 2009.

RIGO, M.P. **Estudo da atividade bioantimutagênica do licopeno em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada. Canoas: Universidade Luterana do Brasil, 2009.

RODRIGUES, C. R. F.; DIAS, J. H.; MELLO, R. N., RICHTER, N. F.; PICADA, J. N.; FERRAZ, A. B. F. **Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice.** Journal of Ethnopharmacology, Limerick, v. 125, p. 97-101, 2009.

RODRIGUES, D.; MELO, S.; GUEDES, P. **Avaliação do impacto da industrialização no aumento de acidentes de trabalho no Brasil (2002 – 2012).** Cad. de Pesq. Interdisc. em Ci-s. Hum-s., Florianópolis. v.16, n. 108, p.26-40. 2015.

SARIKAYA, R.; ERCIYAS, K.; KARA, MI.; SEZER, U.; ERCIYAS, AF.; AY, S. **Evaluation Of Genotoxic And Antigenotoxic Effects Of Boron by the Somatic Mutation and Recombination Test (Smart) On *Drosophila*.** Drug Chem Toxicol. v.39, n.4. Oct. 2016.

SAVIC, S.; FRANCO, N.; GRILLI, B.; BARASCUD, V.; HERZOG, M.; BODE, B.; LOOSLI, H.; SPIELER, P.; SCHÖNEGG, R.; ZLOBEC, I.; CLARK, D.; HERMAN, J.; BUBENDORF, L. **Fluorescence *in situ* hybridization in the definitive diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology.** Chest v. 138, n.1, p.137-44. 2010.

SCHÄRER, D. **Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes.** Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 5, p. 1–9, 2013.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. **Padronização do Teste Cometa para Análise de Genotoxicidade como Atividade de Ensino Para Graduação na Área da Saúde.** Revista Destaques Acadêmicos. v. 5, n. 3, set. 2013.

SCHEUERLEIN H.; HENSCHKE, F.; KÖCKERLING, F. **Wilhelm von Waldeyer-Hartz—A Great Forefather: His Contributions to Anatomy with Particular Attention to “His” Fascia.** Frontiers in Surgery, Lausanne. v. 474. n. 4 Dec. 2017

SCOTT, T. L.; RANGASWAMY, S.; WICKER, C. A.; IZUMI, T. **Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair.** Antioxidants & redox signaling, v. 20, n. 4, p. 708-726, 2014.

SHARIF, A.; ASHRAF, M.; ANJUM, AA.; JAVEED, A.; ALTAF, I.; AKHTAR, MF. **Pharmaceutical wastewater being composite mixture of environmental pollutants may be associated with mutagenicity and genotoxicity.** Environ Sci Pollut Res Int. v.23, p.2813–2820, 2016.

SHARMA, G.; KUMAR, A.; SHARMA, S.; NAUSHAD, M.; DWIVEDI, R.; ALOTHMAN, Z.; MOLA, G. **Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review.** Journal of King Saud University – Science v.31, n.2, p. 257-269 April. 2019.

SILVA, C.; BORGES, F.; BERNARDES, A.; PEREZ, CN.; SILVA, D. **Genotoxic, Cytotoxic, Antigenotoxic, and Anticytotoxic Effects of Sulfonamide Chalcone Using the Ames Test and the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test.** PLOS ONE v.10, n.9, 2015.

SILVA, H.; LOIOLA, C.; PEREIRA, S.; SANTOS, R.; ANDRADE, G.; NUNES, G. **TOXICIDADE AGUDA E GENOTOXICIDADE DO AGROTÓXICO COMERCIAL FOLISUPER 600BR A GIRINOS DE *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEIUPERIDAE).** Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba, v. 23, p. 1-10, jan./dez. 2013.

SILVA, M.; CARIELLO, F. **Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* L. como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais.** Revinter, v. 10, n. 03, p. 39-48, out. 2017.

SILVA, U.G.A. **Avaliação genotóxica dos pesticidas metomil e cipermetrina: efeitos agudos in vivo.** Vitória de Santo Antão: Dissertação (Mestrado em Genética Toxicológica) Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

SILVA, V.; DIHL, R.; LEHMAN, M. **AVALIAÇÃO IN VIVO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DOS FÁRMACOS CISPLATINA E OXALIPLATINA ATRAVÉS DO TESTE SMART EM *Drosophila melanogaster* – RESULTADOS PARCIAIS.** Revista de Iniciação Científica da ULBRA Canoas n.12 p.38-49 2014

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SIQUEIRA, P., LIMA, V., ALMEIDA, T., FRANCO, H., BORBA, H., THODE, S. **Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potentials of the solubilized extract of the coffee waste using *Allium cepa* as a test system.** Ciência e Natura, v.40 n.77. 2018.

SOLOMONS, G. **Química Orgânica.** 9ª ed. São Paulo: LTC, 2013.

SOUSA, T.; ALVES, R.; ALENCAR, M.; PAZ, M.; NUNES, A.; CAVALCANTE, A. **Estudo citogenético de anormalidades cromossômicas em abortos espontâneos.** R. Interd. v. 11, n. 2, p. 97-101, abr. mai. jun. 2018

SOUZA, J.; SOLAREWICZ, M.; MORDASKI, R.; PASSONI, C.; PEREIRA-FERRARI, L.; MIKAMI, L; **Síndromes Cromossômicas: uma revisão.** Cadernos da Escola de Saúde, Curitiba, v.1, n.3, p. 01-12. Dez. 2010.

SPANÓ MA, FREI H, WURGLER FE, GRAF U. **Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test.** Mutagenesis. 2001;16:385-394.

STRACHAN, Tom; READ, Andrew P. *Genética molecular humana*. 4. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2013, 576p.

STRACHAN, TOM; READ, ANDREW P. **Genética Molecular Humana**. 4ª ed., Porto Alegre (RS): ARTMED, 2012.

STRATTON, MR.; CAMPBELL, PJ.; FUTREAL, PA. **The cancer genome**. *Nature*. v.9, n.24 Apr. 2009.

STURBELLE, T., PINHO, S.; DE, R.; ROSSANA, G., OLIVEIRA, GISELE, R.; GARCIAS, L., MARTINO-ROTH, M. **Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da Aloe vera em teste de Allium cepa e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados**. *Rev. bras. Farmacogn.*, Curitiba, v.20, n.3, p.409-415, Jul. 2010.

SULCZEWSKI, F.; MACHADO, A.; CRUZ, I.; PIGATTO, A.; SAGRILLO, M.; KRAUSE, L. **Efeitos Genotóxicos do Extrato Aquoso de Avenca em Linfócitos Humanos**. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde*, Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2014.

TEDESCO, M.; KUHN, A.; AGUIAR, A.; SILVA, A.; TEDESCO, S. **POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Mentha pulegium* L. PELO TESTE DE *Allium cepa* L.** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 1919. 2012..

TEIXEIRA, M. C. V.; BARBÉRIO, A. **Biomonitoramento do ar com *Tradescantia pallida* (Rose) D. R. Hunt var *purpurea* Boom (Commelinaceae)**. *Ambi-Agua*, Taubaté, v. 7, n. 3, p. 279-292, 2012.

THORNE, D.; CROOKS, I.; HOLLINGS, M.; SEYMOUR, A.; MEREDITH, C.; GACA, M. **The mutagenic assessment of an electronic-cigarette and reference cigarette smoke using the Ames assay in strains TA98 and TA100**. *Mutat Res*. v.812, p.29-38. Dec. 2016.

THORNE, D.; HOLLINGS, M.; SEYMOUR, A.; ADAMSON, J.; DALRYMPLE, A.; BALLANTYNE, M.; GACA, M. **Extreme testing of undiluted e-cigarette aerosol in vitro using an Ames air-agar-interface technique**. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. v.828, p.46-54. Apr. 2018.

TOMAZ, B.; FERRI, R.; BOSCHINI, J. **Frequência de micronucleação e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de pacientes anêmicos**. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 18, n. 4, p. 214-220, jan. 2017.

TROUILLER, B.; RELIENE, R.; WESTBROOK, A.; SOLAIMANI, P.; SCHIESTL, RH. **Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice**. *Cancer Res*. v.15, n.69, p.8784 Nov. 2009.

TUDEK, B.; WINCZURA, A.; JANIK, J.; SIOMEK, A.; FOKSINSKI, M.; OLINSKI, R. **Involvement of oxidatively damage DNA and repair in cancer development and aging**. *American journal of translational Research*, Madison, WI, v. 2, n. 3, p. 254 - 284, 2010.

TUDEK, B.; SPEINA, E. **Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis**. *Mutat. Res.* v.736 n.1, p.82-92 Aug, 2012.

VALENTE, Daniel; COSTA-AMARAL, Isabele Campos; CARVALHO, Leandro Vargas Barreto de; SANTOS, Marcus Vinicius Corrêa dos; CASTRO, Vinicio Soares de; RODRIGUES, Daniela del Rosário Flores; FALCO, Anna De; SILVA, Cristiane Barata; NOGUEIRA, Simone Mitri; GONÇALVES, Eline Simões; MOREIRA, Josino Costa; ANDRÉ, Leiliane Coelho; TEIXEIRA, Liliane Reis; SARCINELLI, Paula de Novaes; SISENANDO, Herbert Ary; OLIVEIRA, Monica Stuck de; PERINI, Jamila Alessandra; MATTOS, Rita de Cássia Oliveira da Costa; & LARENTIS, Ariane Leites. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Rev. bras. saúde ocup.**, São Paulo, v. 42, supl.1, e2s, 2017.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. **Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay**. *Mutat Res.* v.681, n.1 p.93-109, Jan-Feb. 2009.

VASQUEZ, M.; ROLAND, F. **The In Vivo Comet Assay Test**. *Genetic Toxicology Testing A Laboratory Manual*, v. 10, p. 345-382. 2016.

VERRI, A. M.; MOURA, A. A.; MOURA, V. M. **Testes Citogenéticos na Avaliação da Genotoxicidade de Produtos Naturais Provindos de Plantas Medicinais**. *Revista UNINGÁ Review*, v. 30, n. 1, p. 55-61, 2017.

VERRI, André Moradore; MOURA, Angélica De Almeida; DE MOURA, Vagner Marques. Testes Citogenéticos na Avaliação da Genotoxicidade de Produtos Naturais Provindos de Plantas Medicinais. **Revista Uningá Review**, [S.l.], v. 30, n. 1, p.55-61. Jan. 2017.

WAGNER, D., PLEWA, M. J. **Chapter 3: Microplate-based Comet Assay**. In Anderson D, Dhawan A, editors, *The Comet Assay in Toxicology*, 2nd Edition. 30 ed. Royal Society of Chemistry.. p. 93-111. 2017.

WANG, J.; SPERKA, T.; RUDOLPH, K. L. **DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer**. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 13, n. 9, p. 579-590, 2012.

WANG, Y., XU, C., DU, L. Q., CAO, J., LIU, J. X., SU, X., LIU, Q. **Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation**. *International journal of molecular sciences*. v.14, n.11, p.22449–22461. 2013.

WELLESLEY, D.; DOLK, H.; BOYD, PA.; GREENLEES, R.; HAEUSLER, M.; NELEN, V.; GARNE, E.; KHOSHNOOD, B.; DORAY, B.; RISSMANN, A.; MULLANEY, C.; CALZOLARI, E.; BAKKER, M.; SALVADOR, J.; ADDOR, MC.; DRAPER, E.; RANKIN, J.; TUCKER, D. **Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates**

from population-based congenital anomaly registers in Europe. Eur J Hum Genet. v.20, n.5, p.521-526. May. 2012.

WOODRUFF, R.; LI, Y.; YAN, J. **Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and comet assay.** J Appl Toxicol, v.32 pp. 934-943. 2012.

XISTO, L.; MARTINS, N.; MORGAN, T.; FREITAS, N. **Utilização da Espécie *Tradescantia pallida* Cv. *purpurea* como Bioindicadora da Qualidade do Ar, Através de Bioensaio de Micronúcleo.** Rev UNICOR. v. 15, n. 2, p.812-821. Ago/dez. 2017.

YAMA, T.; WILSON, D. M. **DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells.** DNA repair, v. 12, n. 8, p. 620-636, 2013.

YANG, H.; ZHANG, X.; LIU, H.; CUI, W.; ZHANG, Q.; LI, Y1.; YU Z1.; JIA, X. **Lanthanum nitrate genotoxicity evaluation: Ames test, mouse micronucleus assay, and chromosome aberration test.** Mutat Res. v.1, n.810, p.1-5, Nov. 2016.

YANG, J., YIN, H., JIA, J., AND WEI, Y. **Facile synthesis of high-concentration, stable aqueous dispersions of uniform silver nanoparticles using aniline as a reductant.** Langmuir v.27, p.5047–5053. 2011.

YANG, L, LUQUETTE, LJ.; GEHLENBORG, N.; XI, R.; HASELEY, PS.; HSIEH, CH.; ZHANG, C.; REN, X.; PROTOPOPOV, A.; CHIN, L. **Diverse mechanisms of somatic structural variations in human cancer genomes.** Cell v.153, p.919–922. 2011.

ZAFRED, R.; SPANO, M.A.; MARTINS, R. **Pro-oxidant Activity and Genotoxicity of the *Astronium fraxinifolium* Using Wing SMART and *Allium cepa* Test.** Journal of Medicinal Plants Research, v.4, n.10, p. 276-285. 2016.

ZHANG, CZ.; LEIBOWITZ, ML.; PELLMAN, D. **Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements.** Genes Dev. v.27, n.23, p.2513-30. Dec. 2013.

ZHAO S., BLICKENSTAFF K., GLENN A., AYERS L., FRIEDMAN S. L., ABBOTT J. W. **β -lactam resistance in *Salmonella* strains isolated from retail meats in the United States by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System between 2002 and 2006.** Appl. Environ. Microbiol. v.75, p.7624–7630. 2009.